Untersuchungen zur in-vivo Transkription des Coliphagen M13

Elard Jacob

1971

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

Untersuchungen zur in-vivo Transkription des Coliphagen M13

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elard Jacob
aus Breslau

München 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Professor Dr. P. H. Hofschneider
2. Referent: Professor Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.1971

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1967 bis März 1971 im Max-Planck-Institut für Biochemie in München unter Leitung von Herrn Professor Dr. P. H. Hofschneider durchgeführt. Sie umfaßt meine Diplom- und Doktorarbeit.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt danke ich für die Förderung meiner Arbeit. Herrn Professor Dr. P. H. Hofschneider bin ich zu Dank verpflichtet für die wissenschaftliche Gesamtanleitung sowie für zahlreiche Einzelanregungen. Der Stiftung Volkswagenwerk gilt mein Dank für ein Stipendium, das mir die Durchführung meiner Doktorarbeit ermöglichte.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0009

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Zusammenfassung	1
B.	Einleitung und Übersicht	3
1	Allgemein	3
2	Speziell	4
2.1	Kleine DNS-Phagen	4
2.2	Replikationsmodus der kleinen einsträngigen DNS-Phagen	5
C.	Methoden und Materialien	9
1	Bakterien und Phagen	9
2	Kulturmedien und Puffer	9
3	Phagenteste	11
4	Messung des Bakterientiters	12
5	Bestimmung der infektiösen Zentren	12
5.1	Versuchsausführung	12
5.2	Herstellung des M13-Antiserums	13
6	Radioaktivitätsmessungen	13
6.1	Messung der TCA-fällbaren Radioaktivität nach Filtration über Zellulosenitratfilter	13
6.2	Messung der an DNS-beladenen Filtern durch Hybridisation gebundenen Radioaktivität	14
6.3	Radioaktivitätsmessung nach Fixieren der Probe auf Filterpapierscheiben	14
6.4	Radioaktivitätsmessung wässriger Proben in einem homogenen Zählsystem	14
7	Herstellung unmarkierter Phagen	15
8	Präparation radioaktiv markierter Phagen	16
8.1	^{32}P-M13-Phagen	16
8.2	^{32}P-M12-Phagen	17
9	Isolierung von M13 RF-DNS	18
9.1	Aufarbeitung M13 RF-haltiger Zellen und Alkalidenaturierung	20
9.2	Reinigung durch Verteilung im Zweiphasensystem Polyäthylenglykol-Dextran	21
9.3	Sedimentation im Zonalrotor	23

Seite

10 Umwandlung der M13 RF in Einzelstränge und Beladen der Hybridisationsfilter 24

10.1 Umwandlung durch DNase 26

10.2 Hitzeumwandlung 27

10.3 Beladen der Hybridisationsfilter mit denaturierter RF II-DNS 28

11 Beladen der Hybridisationsfilter mit (+)-Strang-DNS 28

12 Markierung und Präparation von Nukleinsäuren aus uninfizierten und M13 infizierten Zellen 29

12.1 Langzeitmarkierungen 29

12.1.1 Nukleinsäuren aus infizierten Zellen 29

12.1.2 Nukleinsäuren aus uninfizierten Zellen 29

12.2 Pulsmarkierungen und "Puls-Chase" Experiment 29

12.2.1 Pulsmarkierung zur Charakterisierung der M13 Messenger RNS im Saccharosedichtegradienten 29

12.2.2 Pulsmarkierung zur Bestimmung der Synthesekinetik der M13 spezifischen Messenger RNS 30

12.2.3 "Puls-Chase" Experiment 30

12.2.4 Pulsmarkierungen zur Aggregationskontrolle 31

13 Chromatographie auf Zellulosesäulen 31

14 Bandsedimentation in Saccharosedichtegradienten 32

15 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 32

16 Hybridisation und RNase-Verdau 34

17 Alkalihydrolyse nach Gelelektrophorese 35

18 Bandsedimentation in Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten 36

19 Aggregationskontrolle durch kurzzeitige Titration auf pH 3 36

D. Experimentelle Ergebnisse und Diskussion 38

1 Matrizenfunktion des (-)-Stranges der M13 RF für die phagenspezifische Transkription 38

1.1 Hybridisation der M13 spezifischen Messenger RNS mit M13 RF 44

Seite

1.2 Bestimmung der DNS-Sättigung 46

1.3 Zeitliche Sättigung 48

1.4 Vergleichende Hybridisation von (+)-Strang und denaturierter RF II mit RNS aus infizierten Zellen 50

1.5 Hybridisation von RNS aus uninfizierten Zellen mit denaturierter M13 RF II 50

2 Untersuchungen über die Größenverteilung der M13 spezifischen Messenger RNS 55

2.1 Bandsedimentation in Saccharosedichtegradienten 59

2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 62

2.2.1 Ausschluß einzelsträngiger Phagen-DNS von dreiprozentigen Polyacrylamidgelen 66

2.2.2 Ausschluß fragmentierter DNS von Polyacrylamidgelen 68

2.2.3 Molekulargewichtsbestimmung der M13 Messenger RNS Komponenten durch Gelelektrophorese 71

2.2.4 Synthesekinetik der M13 spezifischen Messenger RNS-Spezies 77

3 Metabolische Stabilität der M13 spezifischen Messenger RNS 79

4 Aggregationskontrollen 89

4.1 Temperaturschock 92

4.2 Sedimentation in Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten 94

4.3 Kurzzeitige Titration auf pH 3 99

5 Schlußdiskussion 102

5.1 Strangspezifität der M13 Messenger RNS 102

5.2 Lebensdauer der M13 Messenger RNS 104

5.3 Größenverteilung der M13 Messenger RNS 107

5.4 Ausblick auf weiterführende Arbeiten 111

E. Literaturverzeichnis 114

Abkürzungen

A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytidin
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure, Dinatriumsalz
F	Festpunkt
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
MG	Molekulargewicht
NDV	Newcastle-Disease-Virus
pfu	Plaque bildende Einheiten
RF	Replikative Form
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
s	Svedbergkonstante
SDS	Natriumlaurylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TMV	Tabakmosaik-Virus
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
TYMV	Turnip-Yellow-Mosaic-Virus
U	Uridin
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat

A. Zusammenfassung

Die einzelsträngige DNS des kleinen Bakteriophagen M13 wird bei der Infektion von Escherichia coli-Zellen durch Synthese des komplementären DNS-Stranges ((-)-Strang) in eine doppelsträngige DNS umgewandelt, die als "Replikative Form" bezeichnet wird. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die in M13 infizierten E. coli-Zellen gebildete phagenspezifische Messenger RNS basenkomplementär zum (-)-Strang der Replikativen Form-DNS ist und damit homolog zur (+)-Strang DNS, die als Einzelstrang im Phagen vorliegt. Die M13 spezifische Messenger RNS wird durch Bandsedimentation in Saccharosedichtegradienten und durch elektrophoretische Auftrennung in Polyacrylamidgelen auf ihre Größenverteilung untersucht. Es werden fünf RNS-Spezies gefunden, denen auf Grund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit die Molekulargewichte 1.3×10^6, 8×10^5, 5×10^5, 3×10^5 und 1×10^5 zugeordnet werden. Das Mengenverhältnis dieser Spezies ändert sich im Lauf der Infektion. Wie Pulsmarkierungsexperimente zeigen, nimmt der Anteil der Spezies vom Molekulargewicht 1×10^5 im Verlauf der Infektion zu. Zwischen den einzelnen Spezies kann keine Zuordnung in dem Sinn getroffen werden, daß bestimmte Spezies Vorläufer oder Degradationsprodukte der anderen sind. Durch Hitzebehandlung, kurzzeitige Titration auf sauren pH oder Behandlung mit Dimethylsulfoxid lassen sich die größeren RNS-Spezies dissoziieren. Daraus wird geschlossen, daß es sich bei ihnen nicht um einzelne RNS-Moleküle handelt, sondern um RNS-Aggregate, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten werden. Ihre mögliche Bedeutung für die Transkription des Phagen M13 wird diskutiert. Wenn die Größenverteilung der M13 Messenger RNS unter Bedingungen untersucht wird, bei denen die Sekundärstruktur von RNS vollständig aufgehoben ist, wie z.B. durch Bandsedimentation über einen Dimethylsulfoxid-Dichte-

gradienten, findet man eine heterogene Größenverteilung, die ein Maximum bei $9x10^4$ aufweist und sich bis zu einem Molekulargewicht von $4\text{-}5x10^5$ erstreckt. Sie wird so interpretiert, daß die phagenspezifische Proteinsynthese in vivo über oligo- bzw. monocistronische Messenger RNS-Moleküle gesteuert wird. Dagegen läßt sich keine M13 spezifische Messenger RNS nachweisen, die in ihrer Länge einer vollen Transkriptionsrunde auf der DNS-Matrize entspricht. Die M13 spezifische Messenger RNS hat eine für Phagen- und Bakterienmessenger ungewöhnlich lange Halbwertszeit von achtzehn bis neunzehn Minuten. Die Halbwertszeit und die Größenverteilung der phagenspezifischen Messenger RNS werden im Hinblick auf ihre mögliche Bedeutung für die Physiologie der M13 Infektion diskutiert.

B. Einleitung und Übersicht

1 Allgemein

Der Coliphage M13 zählt zu der Gruppe der filamentösen Escherichia coli-Phagen vom Typ fd. Diese Untergruppe gehört zu der größeren der Bakteriophagen oder Bakterienviren - einer Gruppe von Viren, die Bakterienzellen als Wirtszellen befallen und sich in ihnen vermehren.

Aus den im folgenden aufgeführten Gründen sind die Bakterienviren eines der am intensivsten untersuchten Forschungsobjekte der Molekularbiologie: 1944 machten Avery, MacLeod und McCarty die Entdeckung, daß die DNS das transformierende Prinzip bei Pneumokokken ist. Damit war gezeigt worden, daß die DNS und das genetische Material einer Zelle gleichzusetzen sind. Die Bakterienviren, die im wesentlichen eine lediglich in einen Proteinmantel oder in eine Proteinkapsel eingeschlossene DNS darstellen, haben sich damit als besonders leicht zugängliche Quelle homogenen genetischen Materials für physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen erwiesen.

Ein ureigenes Interesse kommt den Bakteriophagen als Modellsystem für die Virusvermehrung in einer Wirtszelle zu. Dabei erwies sich als schwerwiegender Vorteil, daß die Generationszeit von Bakterienzellen, die als Wirt dieser Viren fungieren, erheblich kürzer als bei anderen Wirtszellen ist, wie z.B. animalen oder Pflanzenzellen, und das Wirts-Virus-System experimentell leichter zu handhaben ist als in den beiden anderen Fällen. Die Untersuchung dieses Virusmodellsystems geschieht in der Hoffnung, typische Schritte der Virusreplikation aufzuklären, die auch z.B. für animale Viren wesentlich sind, und auf diesem Weg rationale Ansätze zur Therapie viral bedingter Erkrankungen zu finden.

Drittens stellen die Bakteriophagen für die Molekularbiologie bei der Erforschung der genetischen Steuerung einer Zelle insofern ein willkommenes Werkzeug dar, als sie durch die Infektion in der Zelle gezielte Störungen verursachen. Wenn nämlich die Nukleinsäure eines Phagens in der Zelle freigesetzt wird, werden zelleigene Syntheseleistungen auf phagenspezifische umgestellt, und aus der Art der entstandenen Störung lassen sich Rückschlüsse auf die gegenseitigen Stoffwechselbeziehungen in der ungestörten Zelle ziehen.

Die zunächst hauptsächlich untersuchten großen DNS-Phagen wie die virulenten T-Phagen oder die temperenten lambdoiden Phagen verfügen zwar im Vergleich zu ihrer Wirtszelle über ein um ein bis zwei Größenordnungen kleineres genetisches Material, jedoch stellen sie vom Standpunkt des Molekularbiologen, der die sämtlichen Funktionen und Produkte eines Phagengenoms aufklären möchte, noch relativ komplizierte Systeme dar. Bei der Vermehrung eines großen DNS-Phagen wie des Phagen T_4 werden in der Wirtszelle bis zu ungefähr 70 für die Phagenreplikation unerläßliche Gene exprimiert (Kozloff 1968), die durch komplizierte genetische Regulationsmechanismen kontrolliert werden. Es erscheint deshalb zweifelhaft, ob man bei großen Phagen sämtliche Genprodukte und ihre gegenseitige Abhängigkeit in absehbarer Zeit aufklären und biochemisch charakterisieren kann.

2 Speziell

2.1 Kleine DNS-Phagen

Diesem Ziel ist man mit der Entdeckung der kleinen einzelsträngigen DNS-Phagen erheblich näher gerückt. Bei den kleinen Escherichia coli DNS-Phagen unterscheidet man die beiden Untergruppen der sphärischen Phagen vom Typ ØX 174 und S13

und die der filamentösen vom Typ fd. Zu dieser Gruppe zählen die Phagen fd, f1, M13, ZJ/2, Ec 9, AE 2, HR und δA (Marvin u. Hohn, 1969).

Für den zuerst beschriebenen kleinen DNS-Phagen, ØX 174, konnte gezeigt werden, daß er überraschenderweise nicht wie die großen DNS-Phagen eine doppelsträngige DNS besitzt, sondern eine einzelsträngige, die zudem noch zirkulär geschlossen ist (Sinsheimer 1959 a u. b; Fiers u. Sinsheimer, 1962). Das Molekulargewicht der einzelsträngigen DNS der kleinen DNS-Phagen beträgt für ØX 174 1.6×10^6, für die filamentösen Phagen fd und M13 $1.7\text{-}2.0 \times 10^6$. Die Anzahl bekannter Gene beläuft sich bei ØX 174 und M13 auf acht, wobei für M13 geschätzt wurde, daß die Zahl der Gene, die auf der DNS Platz finden, höchstens zwischen acht und zehn liegen sollte. Bei den kleinen DNS-Phagen kann man also hoffen, sämtliche in vivo synthetisierten Proteine fassen und in ihrer gegenseitigen Funktion bezüglich der Virusreplikation aufklären zu können.

2.2 Replikationsmodus der kleinen einsträngigen DNS-Phagen

Der erste Schritt bei der Replikation der kleinen einsträngigen DNS-Phagen ist die Introduktion der einsträngigen zirkulären DNS, im folgenden als (+)-Strang bezeichnet, in die Wirtszelle. Wie Sinsheimer und Mitarbeiter (Sinsheimer, Starman, Nagler u. Guthrie, 1962) zeigen konnten, wird am infizierenden (+)-Strang ein basenkomplementärer (-)-Strang von wirtseigenen Enzymen synthetisiert (Tessman 1966; Stone 1967; Sinsheimer 1968). Auf diese Weise entsteht ein doppelsträngiges DNS-Molekül (die parentale "Replikative Form", abgekürzt: parentale RF), an dem die Synthese weiterer doppelsträngiger DNS (Tochter-RF) abläuft. Bei der Tochter-RF Synthese sowie der Bildung der Einzelstrang-DNS, die schließlich in die Nach-

kommenphagen eingebaut wird, wirken einige wenige phagengesteuerte Funktionen mit vielen wirtsspezifischen zusammen. Die DNS-Synthese kommt z.B. in Zellen, in denen ein bestimmtes Rekombinationssystem des Wirtes defekt ist (rep^--Zellen; Denhardt, Dressler u. Hathaway, 1967), nach Bildung der parentalen RF zum Erliegen, selbst wenn alle phagenspezifischen Replikationsfunktionen intakt sind. In bestimmten temperatursensiblen Mutanten, in denen die DNS-Synthese des Wirtes inhibiert ist (Bonhoeffer 1966), kommt unter nichtpermissiven Bedingungen nicht nur die DNS-Synthese des Wirtes sondern auch die der kleinen einsträngigen DNS-Phagen zum Stillstand (Sinsheimer 1968, S. 150). Aus den Ausfallserscheinungen derart charakterisierter Wirtsfunktionen hofft man, nähere Aufschlüsse über die DNS-Replikation des Wirtes selber gewinnen zu können.

In den bisher erläuterten Punkten weisen die Phagen vom Typ ØX 174 und fd dieselben Vorzüge auf. Für die nähere Untersuchung der DNS-Replikation eines filamentösen DNS-Phagen sprechen jedoch im Gegensatz zu einem sphärischen die folgenden Vorteile: Die Einzelstrangsynthese eines fd-Phagens läuft im Gegensatz zu ØX 174 auch ohne gleichzeitige Proteinsynthese ab (Benzinger 1969; Iwaya u. Denhardt, 1971). Es ist zu erwarten, daß sie aus diesem Grund leichter in vitro zu vollziehen ist. Phagen vom Typ fd lysieren die infizierte Zelle nicht, sondern werden von der sich weiter teilenden und wachsenden Wirtszelle kontinuierlich ausgeschleust (Hofschneider u. Preuss, 1963; Hoffmann-Berling u. Mazé, 1964). Die RF-DNS stellt damit neben dem Bakteriengenom ein zweites persistierendes Replikon in der Zelle dar, das für Modelluntersuchungen über die Regulation eines Replikons herangezogen werden kann (Hayes 1964; Hsu 1968; Marvin 1968). Im sogenannten Metaviruszustand (Hsu 1968), in dem die RF-Synthese stark reduziert aber nicht vollkommen gehemmt ist, stellt die RF-DNS ein Analogon zum reprimierten Zustand transmissibler Plasmide dar und ähnelt

damit z.B. dem Fertilitätsfaktor F oder dem "Resistance Transfer Factor" RTF (Meynell, Meynell u. Datta, 1968).

Weiterhin weist die Reifung eines fd-Phagen interessante Parallelen zur Knospung animaler Viren auf (Marvin u. Hohn, 1969, S. 199). In der infizierten Zelle werden z.B. bei M13 Infektion keine infektiösen Phagen gefunden sondern nur einzelsträngige DNS und freies Strukturprotein (Krug 1968). Wie Untersuchungen über die Synthese des Haupthüllproteins des Phagens zeigen, liegen in der infizierten Zelle ungefähr 20 000 Untereinheiten des Hüllproteins vor, die jedoch nicht frei im Zytoplasma auftreten, sondern möglicherweise in die Membran eingelagert sind (Marvin u. Hohn, 1969). Beim Ausschleusen aus der Zelle könnte dann das Virus zusammengebaut werden. Untersuchungen über die Einlagerung des Hüllproteins in die Membran könnten wertvolle Aufschlüsse über die Struktur der Zellmembran und ihre Funktion als morphopoietischer Faktor bei der Konstruktion von fd-Phagen liefern. Da die Insertion fremder Proteine in Zellplasmamembranen möglicherweise ein gemeinsames Charakteristikum von Krebszellen ist (Wallach 1968), kommt diesen Untersuchungen auch eine allgemeinere Bedeutung für die Theorie der Karzinogenese zu.

Eine zentrale Rolle in der Replikation der kleinen einsträngigen Phagen nimmt die Replikative Form-DNS ein, von der die Synthese weiterer phagenspezifischer DNS ausgeht, die aber andererseits auch als Matrize für die phagengesteuerte Proteinsynthese dient. Beide Prozesse sind eng miteinander verflochten, da die Synthese von Tochter-RF erst einsetzt, wenn die parentale RF transkribiert worden ist.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Charakterisierung der RF-DNS im Hinblick auf den an ihr ablaufenden

Transkriptionsprozeß liefern. Die in M13 infizierten Zellen gefundene phagenspezifische Messenger RNS soll daraufhin untersucht werden, ob sie von beiden Strängen oder nur von einem Strang der doppelsträngigen RF-DNS abgelesen wird und ob nur eine polycistronische Messenger RNS oder mehrere kleine oligo- bzw. monocistronische Messenger gebildet werden. Aus der Analyse dieser Befunde lassen sich Rückschlüsse auf die Zahl der auf der DNS vorhandenen Initiations- und Terminationsstellen ziehen, die für den Synthesebeginn und den Kettenabbruch der einzelnen Messenger RNS-Moleküle sorgen. Derartige Untersuchungen können die Sequenzierungsarbeit an der RF-DNS, die zur Zeit in anderen Arbeitsgruppen in Angriff genommen wird, komplementieren. Auch ist von solchen Untersuchungen zu erwarten, daß sie Aufschluß über die Regulation der Transkription an einem sehr einfachen Modellsystem geben. So kann man die Beantwortung der Frage erhoffen, ob bei einem kleinen DNS-Molekül mit einem Informationsgehalt von nur acht bis zehn Genen wie bei den großen Phagen Lambda oder T_4 ebenfalls eine "Früh-Spät" Regulation wirkt, die mit einem Umschaltvorgang gekoppelt ist, so daß einige Gene von dem einen DNS-Strang abgelesen werden, bestimmte andere dagegen vom Gegenstrang. Weiterhin kann man eine Auskunft darüber erwarten, ob die unterschiedliche Syntheserate der einzelnen phagenspezifischen Proteine auf einer verschieden schnell ablaufenden RNS-Synthese beruht oder erst auf dem Translationsniveau reguliert wird. Der Phage M13 wurde für diese Untersuchungen deshalb gewählt, weil für ihn die meisten genetischen Befunde in der Gruppe der filamentösen Phagen erhoben wurden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit ist der Lebensdauer der M13 Messenger RNS gewidmet. Es soll gezeigt werden, ob die phagenspezifische Messenger RNS mit der für bakterielle Messenger charakteristischen Halbwertszeit abgebaut wird oder ob die Synthese der in der Spätphase der Infektion (Carrierstadium) kontinuierlich benötigten Phagenproteine über stabile Messenger RNS erfolgt.

C. Methoden und Materialien

1 Bakterien und Phagen

Zur Präparation von M13-Phagen sowie für die Präparation von M13 RF-DNS (siehe C 8.1 u. 9) wird Escherichia coli K12 W945/3 F^+, gal^-, Streptomycin^r benutzt, für die radioaktive Markierung M13 spezifischer Messenger RNS (C 12) bzw. von M12-Phagen (C 8.2) Escherichia coli K12 AB 301 F^+, RNase I^-, met^-, his^-, (λ). Die verwendeten Phagen sind M13 und M12 Wildtyp.

2 Kulturmedien und Puffer

Bodenagar enthält in einem Liter deionisiertem Wasser 15 g Difco-Agar, 8 g "Nutrient Broth" und 5 g Natriumchlorid. Nach dreißig Minuten Autoklavieren werden 8 ml 1n Natronlauge zugesetzt.
Weichagar enthält in 100 ml deionisiertem Wasser 1 g Difco-Agar, 0.8 g "Nutrient Broth" und 0.5 g Natriumchlorid.
CW-Agar enthält in 250 ml 7.5 g technische "Casamino Acids" (Difco), 5 g Glyzerin (87 prozentig, p.A.), 0.25 g "Yeast Extract" (Difco), 0.25 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ und 2.5 g Difco-Agar. Nach dreißig Minuten Autoklavieren werden 1.3 ml 1n Natronlauge zugesetzt.
M9-Medium: 7 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, 3 g KH_2PO_4, 0.5 g NaCl, 1 g NH_4Cl und 2 g technische "Casamino Acids" werden mit 970 ml deionisiertem Wasser 30 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden jeweils 10 ml 40 prozentige Glukose, 0.15 prozentiges $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ und 2.46 prozentiges $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ steril zugegeben.
H-Medium (modifiziert nach Maaløe u. Hanawalt, 1961): 12 g Tris (Merck), 2 g KCl, 2 g NH_4Cl, 0.5 g $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ und 0.33 g Na_2SO_4 werden gelöst, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7.4 eingestellt, mit deionisiertem Wasser auf 945 ml

aufgefüllt und dreißig Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden steril zugesetzt: 25 ml 20 prozentige Glukose, 20 ml 0.01m Na_2HPO_4 (für eine Phosphatendkonzentration von $5x10^{-4}$molar, außer wenn anders angegeben), 5 ml technische und 15 ml vitaminfreie "Casamino Acids" der Konzentration 100 mg/ml.

Frazer-Konzentrat enthält in einem Liter 300 g Glyzerin (87 prozentig, p.A.), 10 g NH_4Cl, 5.98 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 442 mg $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ und 100 mg Gelatine.

Delius-Medium für ^{32}P-Phosphatmarkierungen enthält in einem Liter 100 ml Frazer-Konzentrat, 150 ml 0.1m Tris, pH 8.5, 11 g NaCl, 6 g KCl, 5 g Glukose, 5 g technische "Casamino Acids" und 2.5 g "Yeast Extract". Nach dreißig Minuten Autoklavieren werden zu dem abgekühlten Medium steril 5 ml einer 0.1 molaren Na_2HPO_4-Lösung gegeben.

Phosphatpuffer ist $3.94x10^{-2}$m Na_2HPO_4, $2.21x10^{-2}$m KH_2PO_4 und $6.85x10^{-2}$m NaCl.

B/4-Puffer ist $5x10^{-3}$m Natriumphosphat (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 = 1:1) und 10^{-3}m EDTA.

Borat-EDTA Puffer ist $3.8x10^{-2}$m $Na_2B_4O_7$ und 10^{-3}m EDTA.

NaCl-Tris Puffer ist 0.1m NaCl, 0.1m Tris, pH 8.0.

NaCl-Tris-EDTA Puffer ist 0.1m NaCl, 0.1m Tris, pH 8.0, 0.1m EDTA.

Phenol zur Deproteinisierung von Rohnukleinsäuren bei der RF-Präparation (C 9) und zur Isolierung der DNS von M13-Phagen (C 8.1) ist gegen 0.1m NaCl, 0.1m Tris (ohne pH-Einstellung), 10^{-3}m EDTA äquilibriert und enthält in einem Liter puffergesättigtem Phenol 80 mg 8-Oxychinolin.

Phenol zur Präparation von RNS aus M12-Phagen (C 8.2) und aus radioaktiv markierten Zellen (C 12) ist gegen 0.01m Tris, pH 7.4, 0.05m KCl, 10^{-3}m EDTA äquilibriert.

Puffer A ist $1.4x10^{-2}$m NaH_2PO_4, $6x10^{-3}$m Na_2HPO_4, $2x10^{-3}$m NaCl und $2x10^{-3}$m EDTA.

Der Puffer "2xSSC" ist 0.3m NaCl und 0.03m Trinatriumzitrat. Er wird mit verdünnter Salzsäure auf einen pH von

7.0 eingestellt. "4xSSC" hat die doppelte, "10xSSC" die fünffache und "20xSSC" die zehnfache Konzentration.
STE-Puffer ist 0.1m NaCl, 0.05m Tris, pH 7.0, 10^{-3}m EDTA.
Tris-KCl-EDTA Puffer: 0.01m Tris, pH 7.4, 0.05m KCl, 10^{-3}m EDTA.
Puffer 3E ist 0.12m Tris-Azetat, pH 7.2, 0.06m Natriumazetat, $2x10^{-3}$m EDTA.
Puffer E ist Puffer 3E 1:3 verdünnt. Er enthält außerdem 0.2% SDS.
Puffer E/10 ist $4x10^{-3}$m Tris-Azetat, pH 7.2, $2x10^{-3}$m Natriumazetat, 10^{-3}m EDTA, 0.2% SDS und 5% (v/v) Glyzerin.
Eis-Azid Puffer ist eine Mischung aus 30 g gestoßenem Eis (aus deionisiertem Wasser), 6 ml 0.1m Natriumazid, 0.066m Tris-HCl, pH 7.8, 0.066m Natriumchlorid und 0.033m Magnesiumchlorid.
Azid-Waschpuffer ist 0.01m Natriumazid, 0.01m Tris-HCl, pH 7.8, 0.01m Natriumchlorid und $5x10^{-3}$m Magnesiumchlorid.

3 Phagenteste

Die Phagenteste wurden zum Teil auf E. coli W945/3, zum Teil auf E. coli AB 301 durchgeführt. Die erzielten Titer waren dabei ähnlich oder identisch, wenn zum Austesten jeweils eine frische Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase oder frühen stationären Phase benutzt wurde. Die Phagenteste wurden zunächst auf Bodenagarplatten durchgeführt, wobei 3 ml 45°C warmer Weichagar, ungefähr 0.1 ml Bakteriensuspension und 0.1 ml der entsprechenden Phagenvorverdünnung in Phosphatpuffer auf dem Bodenagar ausplattiert wurden. Später wurden - bei identischen Ergebnissen - die Phagenteste ohne Bodenagar mit 5 ml 45°C warmem CW-Agar anstelle des Weichagars durchgeführt. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

4 Messung des Bakterientiters

Der Bakterientiter wird unter dem Phasenkontrastmikroskop in einer Thoma-Zählkammer mit der Schichtdicke 0.02 mm bestimmt.

5 Bestimmung der infektiösen Zentren

5.1 Versuchsausführung

Zur Bestimmung der infektiösen Zentren wird zu den angegebenen Zeiten der infizierten Kultur ein Aliquot entnommen, eins zu zehn in Phosphatpuffer (C 2) verdünnt, abzentrifugiert, einmal mit diesem Puffer gewaschen und in dem ursprünglichen Probenvolumen in Phosphatpuffer resuspendiert. Nach einer 1:100 Verdünnung in diesem Puffer werden 0.5 ml entnommen und mit 0.05 ml Kaninchen-M13-Antiserum zur Entfernung aller freien M13-Phagen zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Es wird auf 10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4} verdünnt und plattiert, so daß die Gesamtverdünnung 10^{-4}, 10^{-5} und 10^{-6} beträgt. Zur Kontrolle der Antiseruminaktivierung werden dem Ansatz nach Antiserumeinwirkung 0.1 ml entnommen, die mit 0.9 ml Phosphatpuffer 1:10 verdünnt und mit zwei bis drei Tropfen Chloroform zur Lyse der infizierten Bakterien eine Minute bei Eisbadtemperatur geschüttelt werden. Nach Verdünnen auf 10^{-1}, 10^{-2} und 10^{-3} wird plattiert. Im Chloroformkontrollansatz werden im typischen Fall weniger als 0.1% des Titers nach Antiseruminaktivierung aber ohne darauf folgende Chloroformbehandlung gefunden. Alle Plattierungen werden mit CW-Agar wie in C 3 beschrieben durchgeführt.

5.2 Herstellung des M13-Antiserums

Nach dem von Krug (1968) beschriebenen Verfahren werden zwei Kaninchen zehnmal im Abstand von jeweils 3 bis 4 Tagen mit je 0.1 ml einer Suspension von 9×10^{12} M13-Phagen pro Milliliter in Phosphatpuffer intravenös, intramuskulär und subkutan immunisiert. Die Phagensuspensionen für die intramuskulären und subkutanen Injektionen werden zuvor mit je 0.2 ml Aluminiumhydroxidgel vermischt. Nach fünf Wochen erfolgt eine weitere Serie von Injektionen. Zehn Tage danach wird das Blut entnommen. Nach Gerinnung wird der Blutkuchen vom Serum abzentrifugiert und das Serum nacheinander gegen intakte E. coli-Zellen und gegen einen Extrakt aus diesen Bakterien erschöpft. Für die oben beschriebenen Versuche wird eine 1:100 Verdünnung des Antiserums in Phosphatpuffer verwendet.

6 Radioaktivitätsmessungen

6.1 Messung der TCA-fällbaren Radioaktivität nach Filtration über Zellulosenitratfilter

Zur Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität einer Probe wird ein Aliquot mit 5 ml zehnprozentiger eiskalter Trichloressigsäure (TCA) gefällt und über Membranfilter mit 0.60 µ Porenweite (Sartorius, Göttingen) durch Anlegen eines Vakuums abfiltriert. Das Filter wird mit ungefähr 20 ml Wasser nachgewaschen, eine Stunde bei $90^{\circ}C$ getrocknet und in einem Toluolszintillationssystem in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Tricarb, Packard) gezählt. Das Toluolszintillationssystem enthält in einem Liter Toluol 3.6 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0.45 g 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (Dimethyl-POPOP).

6.2 Messung der an DNS-beladenen Filtern durch Hybridisation gebundenen Radioaktivität

Nach Hybridisation (C 16) werden die Hybridisationsfilter eine Stunde bei 90°C getrocknet und anschließend im Toluolszintillationssystem (C 6.1) gezählt.

6.3 Radioaktivitätsmessung nach Fixieren der Probe auf Filterpapierscheiben

Bei Probevolumina unter 0.1 ml, speziell wenn die ganze Probe gefällt werden soll oder keine Korrelation mit Hybridisationsexperimenten erforderlich ist, werden die Proben direkt auf Whatman-Papierfilter (Nr. 3) getropft, nach kurzem Antrocknen nacheinander in eiskalter zehnprozentiger TCA, fünfprozentiger TCA, Äthanol/Diäthyläther im Verhältnis 1:1 und schließlich in Diäthyläther jeweils 15 Minuten gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt werden die Filter auf Zellstoff ausgelegt und nach Abdunsten des Äthers direkt im Toluolszintillationssystem (C 6.1) gezählt.

6.4 Radioaktivitätsmessung wässriger Proben in einem homogenen Zählsystem

Bei gelelektrophoretischen Auftrennungen, denen keine Hybridisationsexperimente folgen, werden die Gelscheiben eine halbe Stunde bei 37°C mit je 0.5 ml einer Mischung aus (I.) 9 ml Piperidin, p.A., (II.) 10 ml Hyaminhydroxid 10-X (= p-(Diisobutyl-cresoxyäthoxyäthyl)-dimethylbenzylammoniumhydroxid), 1m Lösung in Methanol, Packard) und (III.) 81 ml deionisiertem Wasser in Plastikszintillationsröhrchen aufgelöst. Es werden je Röhrchen 10 ml Kinard's Reagens zugegeben, dann werden die Röhrchen geschüttelt und nach zwei Stunden gezählt.

Kinard's Reagens setzt sich wie folgt zusammen: In 0.5 l Xylol, 0.5 l Dioxan und 0.3 l absolutem Äthanol werden 104 g

Naphthalin ("für Szintillationszwecke"), 6.5 g 2,5-Diphenyloxazol und 0.065 g α-Naphthylphenyloxazol gelöst.

7 Herstellung unmarkierter Phagen

Unmarkierte M13-Phagen für Infektionszwecke werden in M9-Medium (C 2) auf E. coli W945/3 bei 37°C gezogen. Bei einem Bakterientiter von $2x10^8$ Zellen/ml wird mit einer Multiplizität von 20 infiziert, und nach zwei bis drei Stunden werden die Zellen in einem sterilen Zentrifugenbecher abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein steriles Gefäß abgeschüttet, wie unter C 3 beschrieben ausgetestet und zum Infizieren von Kulturen zur Präparation von M13 RF bzw. von ^{3}H-Uracil markierten Nukleinsäuren verwendet. Die gewöhnlich erzielten Phagentiter liegen zwischen $5x10^{11}$ bis $1x10^{12}$ pfu/ml.

Zur Darstellung größerer Mengen unmarkierter M13-Phagen wird die folgende Modifikation verwendet: Der Überstand der infizierten Kultur - gewöhnlich ein 10 Liter Ansatz - wird nach Abzentrifugieren durch langsames Einrühren von Polyäthylenglykol 6 000 (Serva, Heidelberg, MG ∿ 6 000 - 7 500, F = 60-63°C) und festem Natriumchlorid auf 5% Polyäthylenglykol und 0.5m Natriumchlorid gebracht. Der Ansatz wird über Nacht bei +2°C stehen gelassen und am anderen Tag in der MSE Mistral Zentrifuge bei +2°C, 5 000 upm abzentrifugiert. Das Sediment wird in 15 ml B/4-Puffer (C 2) aufgenommen, zweimal gegen einen Liter dieses Puffers dialysiert und auf drei Stufengradienten im SW 27 Christ-Rotor verteilt. Die Stufengradienten werden aus je 5 ml 38 prozentiger, 30.5 prozentiger und 27 prozentiger Cäsiumchloridlösung in B/4-Puffer und 10 ml 11 prozentiger Saccharoselösung in B/4-Puffer geschichtet. Nach acht Stunden bei 26 000 upm, 4°C werden die Gradienten fraktioniert, die phagenhaltigen Fraktionen werden vereinigt und gegen B/4-

Puffer ausdialysiert. Je 6.5 ml des Dialysats werden mit 2.74 g Cäsiumchlorid gemischt und im Ti 50 Winkelrotor (Beckman) einer Gleichgewichtszentrifugation (40 000 upm, 20 Std., 10°C) unterworfen. Die Phagenbande, etwa in der Mitte des Röhrchens gelegen und an ihrem Tyndalleffekt erkennbar, wird, während der Gradient abtropft, in einem gesonderten Reagensglas aufgefangen und gegen Borat-EDTA Puffer (C 2) ausdialysiert. Die so präparierten Phagen haben einen Titer von ungefähr 10^{14} pfu/ml und weisen bei einer Endverdünnung von 10^{-3} keine Fremdphagen auf. Eine Verdünnung dieser Phagen in sterilem Borat-EDTA Puffer wird zur Infektion von Kulturen bei ^{32}P-Phosphatmarkierungen verwendet.

Unmarkierte M12-Phagen werden in M9-Medium bei 37°C auf E. coli AB 301 gezogen. Dazu wird die Kultur bei einer Zelldichte von $2x10^{8}$/ml mit einer Multiplizität von 10 infiziert und bis zur klaren Lyse belüftet. Nach Austesten ihres Titers auf AB 301 werden die Phagen ohne weitere Reinigung verwendet.

8 Präparation radioaktiv markierter Phagen

8.1 ^{32}P-M13-Phagen

Aus einer frischen Übernachtkultur werden E. coli W945/3 1:500 in H-Medium ($5x10^{-4}$m Phosphat, C 2) überimpft, bei 37°C bis zu einem Titer von $2x10^{8}$ Zellen/ml gezogen und mit einer Multiplizität von 20 mit M13 infiziert. Gleichzeitig werden 0.5 mCi/ml trägerfreies ^{32}P-Orthophosphat (Buchler, Braunschweig) zugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation werden die Zellen bei 8 000 upm in der MSE High-speed-18 Zentrifuge abzentrifugiert, und je 9 ml des Überstandes werden mit 3.76 g Cäsiumchlorid gemischt und im Spinco Ti 50 Winkelrotor zwanzig Stunden bei 40 000 upm,

10°C zentrifugiert. Der Inhalt der Zentrifugenröhrchen wird durch Abtropfen durch eine Kanüle der Größe 2 jeweils in ungefähr 20 Fraktionen aufgetrennt, und 10 µl Aliquots jeder Fraktion werden durch TCA-Fällung auf Papierfiltern (C 6.3) auf ihre Radioaktivität ausgemessen. Die phagenhaltigen Hauptfraktionen werden vereinigt und durch Filtration über eine mit Borat-EDTA Puffer (C 2) äquilibrierte 10 cm x 2 cm Sephadex G75-Säule mit Dextranblau zur Markierung des Ausschlußvolumens vom Cäsiumchlorid und nicht in Phagen eingebauten ^{32}P-Phosphat befreit. Die Phagenfraktionen werden vereinigt, zwanzig Minuten bei 37°C in 1% SDS inkubiert und fünf Minuten phenolisiert (C 2), um die ^{32}P-markierte Phagen-DNS vom Proteinmantel zu befreien. Nach Zentrifugation wird die Oberphase isoliert und mit Äthanol gefällt. Die DNS wird nach Abzentrifugieren in Puffer E (D 2.2.1) bzw. 0.1m Tris, 1mM EDTA, pH 7.8 (D 4) resuspendiert.

8.2 ^{32}P-M12-Phagen

E. coli AB 301 werden in Delius-Medium (C 2) aus einer frischen Übernachtkultur 1:500 angeimpft, bei 37°C bis zu einer Zelldichte von $2x10^8$/ml gezogen und mit einer Multiplizität von 10 mit M12 infiziert. Gleichzeitig wird trägerfreies ^{32}P-Phosphat (0.5 mCi/ml Kultur) zugegeben. Die Zellen werden bis zur klaren Lyse, mindestens jedoch bis vier Stunden nach Infektion weiter inkubiert. Dann werden die nichtlysierten Zellen bzw. die Zellfragmente durch dreißigminütige Zentrifugation bei 8 000 upm in der MSE Highspeed-18 Zentrifuge abgetrennt, und je 9 ml des Überstandes werden mit 6.38 g Cäsiumchlorid gemischt. Das weiter folgende Verfahren ist unter C 8.1 beschrieben mit der Ausnahme, daß Tris-KCl-EDTA äquilibriertes Phenol verwendet wird (C 2).

9 Isolierung von M13 RF-DNS

Zur Isolierung der M13 RF-DNS werden zwei verschiedene Methoden beschrieben. Die eine (C 9.2) ist eine Modifikation (Jaenisch, unveröffentlichte Ergebnisse) der von Albertson (1962, 1965) und Rudin u. Albertson (1967) beschriebenen Verteilung nativer und hitzedenaturierter DNS bzw. von DNS-RNS Gemischen in einem wässrigen Zweiphasensystem aus Polyäthylenglykol und Dextran. Die zweite Methode (C 9.3) besteht in der Zentrifugation der alkalidenaturierten Nukleinsäuren aus M13-infizierten Zellen über einen alkalischen Saccharosedichtegradienten in einem BXIV-Zonalrotor (Jaenisch, Hofschneider u. Preuss, 1969).

M13 RF kommt wie ØX 174 RF in zwei verschiedenen Formen vor, die als Komponente I und II bezeichnet werden (Jansz u. Pouwels, 1965). Komponente I ist ein in beiden Strängen kovalent geschlossenes doppelsträngiges DNS-Molekül, Komponente II weist in einem der beiden Stränge einen Einzelstrangbruch auf. Da in RF I beide Stränge kovalent geschlossen sind und die beiden Stränge außerdem umeinander gewunden sind, kann RF I durch Alkalibehandlung oder kurzfristiges Erhitzen nicht in ihre Einzelstränge zerlegt werden, während unter denselben Bedingungen RF II zu einsträngiger DNS denaturiert wird (Ray, Bscheider u. Hofschneider, 1966; Ray, Preuss u. Hofschneider, 1966; Jaenisch, Hofschneider u. Preuss, 1966). Die Resistenz der RF I Komponente gegenüber denaturierenden Bedingungen läßt sich für ihre Isolierung ausnützen, indem man die Coli-DNS, die leicht denaturierbar ist, in ihre Einzelstränge aufspaltet und anschließend von der doppelsträngig gebliebenen RF I abtrennt. Allerdings wird bei der Denaturierung der Coli-DNS auch die RF II Komponente in ihre Einzelstränge zerlegt und geht bei der Aufarbeitung verloren.

Die Trennung der doppelsträngigen RF I von der einzelsträngigen Coli-DNS (und denaturierten RF II) erfolgt bei der ersten Methode auf Grund der unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten, die einsträngige bzw. doppelsträngige DNS in dem Zweiphasensystem Polyäthylenglykol-Dextran bei bestimmten Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen aufweisen. Das verwendete Verfahren (C 9.2) ist im Prinzip eine stark vereinfachte Gegenstromverteilung.

Eine andere Möglichkeit, RF I von der einsträngigen DNS abzutrennen, besteht in der unterschiedlichen pH-Abhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten der RF I und einsträngiger DNS. Wie von Vinograd und Mitarbeitern (Vinograd, Lebowitz, Radloff, Watson u. Laipis, 1965) an Polyoma-DNS und von Pouwels und Mitarbeitern, (Pouwels, Knijnenburg, van Rotterdam, Cohen u. Jansz, 1968) an ØX RF I gezeigt wurde, nimmt der Sedimentationskoeffizient zirkulärer, kovalent geschlossener doppelsträngiger DNS mit steigendem pH zu, während der einsträngiger DNS praktisch unbeeinflußt bleibt. Bei einem pH von 12.4 - 12.5 wandert die M13 RF I mit einem Sedimentationskoeffizienten von angenähert 50s (vergl. Ray, Preuss u. Hofschneider, 1966) und kann von der langsamer sedimentierenden einzelsträngigen Coli-DNS in einem alkalischen Saccharosedichtegradienten abgetrennt werden. Dieser Weg wurde in C 9.3 eingeschlagen. Zur Erhöhung der Auftrennungskapazität des Gradienten wurde ein Zonalrotor verwendet (Anderson 1966).

Bei beiden Methoden (C 9.2 und C 9.3) wird das aus M13 infizierten Zellen erhaltene Gemisch aus doppelsträngiger M13 RF-DNS, Coli-DNS, einzelsträngiger M13 DNS und den verschiedenen RNS auf einen pH von 12.5 gebracht, bei dem Coli-DNS und M13 RF II in einzelsträngige DNS umgewandelt werden, die Strangtrennung bei RF I dagegen nicht erfolgt. Kurz darauf wird die Nukleinsäurelösung sehr schnell re-

neutralisiert, so daß die komplementären Stränge, die aus Coli-DNS und M13 RF II entstanden sind, nicht mehr reassoziieren können. M13 RF I dagegen, deren Stränge bei pH 12.5 zwar nicht mehr vollständig durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden waren, aber noch durch die Verflechtung der beiden kovalent geschlossenen DNS-Stränge zusammengehalten wurden, renaturiert praktisch momentan und erhält ihre ursprünglich doppelsträngige Konfiguration wieder.

Die Abtrennung der in dem Nukleinsäuregemisch ebenfalls vorliegenden RNS-Arten erfolgt entweder während der Verteilung im Zweiphasensystem (C 9.2) oder teilweise durch eine Salzfällung vor der Zonalzentrifugation (C 9.3). Der Rest der begleitenden RNS wird bei der Zonalzentrifugation im Gradienten abgetrennt. Eine vorangehende Salzfällung erhöht die Trennkapazität des Zonalrotors.

Beide Methoden ergaben RF-DNS, die in Bezug auf die Hybridisation identische Ergebnisse lieferten. Die erste Methode (C 9.2) wurde für die Charakterisierung der Matrizeneigenschaft des M13 RF (-)-Stranges (D 1) verwendet, anschließend nur noch die unter C 9.3 beschriebene Zonalzentrifugation.

9.1 Aufarbeitung M13 RF-haltiger Zellen und Alkalidenaturierung

Bei beiden Methoden werden die Nukleinsäuren bis einschließlich der Alkalidenaturierung identisch aufgearbeitet: E. coli W945/3 Zellen werden in M9-Medium (C 2) aus einer frischen Übernachtkultur 1:500 angeimpft - gewöhnlich in 10 Liter Kulturmedium -, bei 37°C bis 1.5×10^8 Zellen/ml gezogen, mit einer Multiplizität von 20 mit M13 infiziert und weitere 1.5 Stunden inkubiert. Die Zellen werden dann in der MSE Mistral Zentrifuge 30 Minuten bei 5 000 upm, +2°C abzentrifugiert, einmal mit NaCl-Tris Puffer (C 2) gewaschen und in 300 ml NaCl-Tris-EDTA Puffer (C 2) resuspendiert. Anschließend wer-

den sie mit Lysozym (100 µg/ml) zehn Minuten bei 37°C inkubiert, um die Zellwände der Bakterien enzymatisch anzudauen. Da durch physikalische Schädigung der Bakterienzellwand, z.B. durch Einfrieren und Auftauen, die spätere Lyse der Zellen leichter erfolgt, wird der Ansatz über Nacht bei -20°C eingefroren, am nächsten Tag aufgetaut und weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die inzwischen bereits zäh gewordene Zellsuspension wird auf 1% SDS gebracht und bei 37°C unter gelegentlichem Rühren bis zur vollständigen Aufhellung inkubiert. Der Ansatz wird durch dreimaliges Phenolisieren (Phenol siehe C 2) vom Protein befreit. Die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase werden mit Alkohol gefällt und je 10 Liter Kulturäquivalent in 100 ml B/4-Puffer (C 2) aufgenommen. Nach vollständiger Resuspension werden die Nukleinsäuren unter mäßigem Rühren auf einem Magnetrührer mit 1n Natronlauge langsam auf pH 12.5 gebracht, wobei das benötigte Volumen für die später erfolgende Reneutralisation gemessen wird. Dabei wird der pH laufend an einem pH-Meter (Radiometer, Kopenhagen) überwacht. Die pH-Einstellung von 12.5 sollte nach ungefähr 5 Minuten erreicht sein. Nach weiteren 5 Minuten wird möglichst rasch unter starkem Rühren dasselbe Volumen 1n Salzsäure in die Nukleinsäurelösung pipettiert, um innerhalb der kürzest möglichen Zeit auf neutralen pH zurückzukommen. Dabei sind rasches Pipettieren und möglichst starkes Rühren von ausschlaggebender Bedeutung für das Gelingen der Alkalidenaturierung. Es entsteht ein voluminöses Proteinpräzipitat, welches wie weiter unten beschrieben entfernt wird.

9.2 Reinigung durch Verteilung im Zweiphasensystem Polyäthylenglykol-Dextran

Das weiße Präzipitat wird durch dreißigminütige Zentrifugation in der MSE Highspeed-18 Zentrifuge bei +2°C und 12 000 upm abgetrennt und der Überstand über Nacht gegen Puffer A

(C 2) ausdialysiert. Nun wird er mit dem gleichen Volumen einer wässrigen Lösung aus 8% Polyäthylenglykol 6 000 (Serva, Heidelberg) und 10% Dextran 500 (Pharmacia, Uppsala, Schweden; MG ∿ 500 000) durch einminütiges Schütteln äquilibriert. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten in diesem System (a) betragen nach Äquilibrieren 4% Polyäthylenglykol, 5% Dextran, 10^{-2}m Phosphat, 10^{-3}m NaCl und EDTA. Bei 0^{o}C trennt sich das System bei längerem Stehen oder bei Zentrifugation in zwei gleichvolumige Phasen. Bei der angegebenen Salzkonzentration bleibt native DNS in der Oberphase, während denaturierte DNS und RNS in die Unterphase extrahiert werden. Die Oberphase wird isoliert und zu ihr das gleiche Volumen einer frischen Unterphase gegeben, die folgendermaßen hergestellt wird: Die oben angegebene Stammlösung von 8% Polyäthylenglykol und 10% Dextran wird mit demselben Volumen Puffer A äquilibriert (System b) und die Unterphase nach Zentrifugation abgetrennt und verwendet. Nach Schütteln und Abzentrifugieren gibt man zu der neu entstandenen Oberphase 1/10 Volumen frischer Unterphase zu, die wie aus System b gewonnen wird, nur daß in diesem Fall der Puffer A einmolar an Natriumchlorid ist. Bei Äquilibrieren des Systems und Phasentrennung geht M13 RF bei dieser Kochsalzkonzentration quantitativ in die Unterphase und wird so ungefähr zehnfach konzentriert. Die Unterphase extrahiert man mit 10^{-3} molar Natriumchlorid enthaltenden frischen Oberphasen, die man sich auf dieselbe Weise herstellt wie für die Unterphasen beschrieben. Bei ungefähr der fünften Extraktion wird M13 RF unter diesen Bedingungen in die Oberphase extrahiert. Die Oberphasen des vierten, fünften und sechsten Extraktionsschrittes werden zusammengegeben und zur weiteren Reinigung von mitgeschleppter denaturierter DNS und von RNS noch zweimal mit frischen Unterphasen (10^{-3}m NaCl) extrahiert. Dann wird die Oberphase zur Entfernung des Polyäthylenglykols und Dextrans zweimal mit demselben Volumen Chloroform/n-Oktanol (9:1) extrahiert. Die verbleibende

Oberphase wird isoliert. Sie enthält die M13 RF I-DNS. Die Ausbeute liegt um 100 µg RF-DNS pro Liter M13 infizierter Bakterienkultur.

Anschließend wird eine Filtration über eine Glassäule definierter Porengröße (550 Å, 34 ml Ausschlußvolumen; adaptiert nach Gschwender, Haller u. Hofschneider, 1969) mit Borat-EDTA Puffer (C 2) durchgeführt, bei der niedermolekulares, UV-absorbierendes Material entfernt wird. Die Bande, die im Ausschlußvolumen wandert, ist M13 RF I.

9.3 Sedimentation im Zonalrotor

Die Nukleinsäuren werden nach Alkalidenaturierung durch Zugabe von fünfmolarer Natriumchloridlösung auf einmolar Natriumchlorid gebracht, über Nacht bei 0°C aufbewahrt und bei 0°C in der MSE Highspeed-18 Zentrifuge eine Stunde bei 12 000 upm zentrifugiert. Die Nukleinsäuren des Überstands, die auf diese Weise vom Protein und vom Großteil der fällbaren einzelsträngigen RNS befreit wurden, werden mit Äthanol gefällt und in 20 ml B/4-Puffer (C 2) aufgenommen. Sie werden durch Zugabe von 1n Natronlauge auf pH 12.5 gebracht und auf einen 10-30 prozentigen Saccharosegradienten, pH 12.5, in einem BXIV Titan-Zonalrotor geschichtet (Jaenisch, Hofschneider u. Preuss, 1969). Nach fünf Stunden Zentrifugation bei 47 000 upm wird der Gradient durch Unterschichten von Saccharoselösung höherer spezifischer Dichte abgepumpt. Die UV-Absorption des Gradienten wird dabei durch Messung in einer Durchflußküvette bei einer Wellenlänge von 260 mµ bestimmt. Die Bande mit der M13 RF-DNS wird isoliert und neutralisiert. Die Ausbeute an RF I liegt zwischen 100 und 200 µg pro Liter M13 infizierter Bakterienkultur.

10 Umwandlung der M13 RF in Einzelstränge und Beladen der Hybridisationsfilter

Für den Hybridisationstest muß die in beiden Strängen kovalent geschlossene zirkuläre RF I-DNS in ihre Einzelstränge zerlegt werden, damit sie mit einer komplementären RNS Wasserstoffbrückenbindungen zur Ausbildung von DNS-RNS Hybriden eingehen kann. Die einsträngige DNS, die mit einer der weiter unten beschriebenen Methoden erhalten wird, kann entweder direkt zur Hybridisation eingesetzt werden, wie für die Dimethylsulfoxid-Gradienten in C 16 und C 18 beschrieben, oder nachdem sie auf Zellulosenitratfilter fixiert worden ist (Gillespie u. Spiegelman, 1965).

Die Umwandlung der RF I in Einzelstränge erfolgt auf zwei verschiedene Weisen. Die erste Methode (C 10.1) besteht darin, mit Hilfe von pankreatischer DNase in das doppelsträngige, kovalent geschlossene RF I-Molekül Einzelstrangbrüche einzuführen, die gestatten, die entstandene RF II durch eine anschließende Alkalidenaturierung in die komplementären Einzelstränge zu zerlegen. Da die pankreatische DNase mit gleicher Wahrscheinlichkeit RF I und RF II angreift, wird der Enzymverdau dann unterbrochen, wenn im statistischen Mittel ein Einzelstrangbruch pro zwei RF-Moleküle eingeführt worden ist. Das ist nach der Poissongleichung bei einer dreißigprozentigen Umwandlung von RF I in RF II der Fall. Zwar ist die Ausbeute an RF II-Molekülen mit nur einem Einzelstrangbruch bei einem siebzigprozentigen Umwandlungsgrad (bei dem im Mittel alle Moleküle einen Einzelstrangbruch haben) höher (36% der RF II-Moleküle gegenüber 31% bei einem dreißigprozentigen Umwandlungsgrad), jedoch ist die Zahl der Moleküle mit zwei und mehr Einzelstrangbrüchen von ungefähr 9% auf 28% gestiegen.

Da der Enzymverdau bei der verwendeten Enzymkonzentration von nur 2×10^{-4} µg/ml mit einer von Ansatz zu Ansatz variieren-

den, schlecht reproduzierbaren Geschwindigkeit verläuft, wird der Umwandlungsgrad zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der DNase-Einwirkung in einer DNase-Kinetik gemessen (Vinograd, Lebowitz u. Watson, 1968; C 10.1). Sie wird bei einer dreißigprozentigen Umwandlung beendet. Anschließend wird die entstandene RF II durch Alkalidenaturierung in die Einzelstränge zerlegt. Bei Filtration über Zellulosenitratfilter wird nur die einsträngige DNS auf den Filtern zurückgehalten, während die beim DNase-Verdau nicht umgewandelte doppelsträngige RF I-DNS verloren geht.

Die zweite Methode (C 10.2) bedient sich des Umstandes, daß in eine doppelsträngige, kovalent geschlossene zirkuläre DNS bei längerem Erhitzen leichter Einzelstrangbrüche eingeführt werden als in eine einsträngige DNS (Hudson 1969). Sobald in ein Molekül RF I durch Hitze ein Einzelstrangbruch eingeführt worden ist, trennen sich die beiden komplementären Stränge und werden langsamer als RF I weiter fragmentiert. Die größte Ausbeute an unfragmentierten Einzelsträngen wird bei sechzigprozentiger Umwandlung von RF I erzielt.

Die Filter, die mit nach C 10.1 oder C 10.2 präparierter DNS beladen werden (C 10.3) ergeben identische Resultate. Die in C 10.1 beschriebene Methode (a) wurde für die Experimente D 1, 2.1 und 2.2 herangezogen.

Die nach C 9.2 oder C 9.3 gewonnene M13 RF I-DNS wird auf 0.2m Kaliumazetat gebracht, mit Äthanol gefällt und in ungefähr 10 ml B/4-Puffer (C 2) aufgenommen. Die Konzentration wird im Zeiss Spektralphotometer durch Messung der Extinktion bei 260 mμ gegen B/4-Puffer bestimmt (45 μg RF $\triangleq$ 1 $E^{1\ cm}_{260}$, Sinsheimer 1966).

10.1 Umwandlung durch DNase (Methode a)

In die DNS-Lösung, die ungefähr 50 µg DNS/ml enthalten soll, wird 1:10 eine Lösung aus $2x10^{-3}$ µg/ml pankreatischer DNase (Worthington Biochemical Corp.), 0.024m Magnesiumchlorid, 0.02m Tris, pH 7.5 und 0.06m Natriumchlorid verdünnt und bei 20°C 20 Minuten inkubiert. Der Ansatz wird in flüssiger Luft eingefroren. Zuvor wird eine 25 µl Probe entnommen, weitere DNase-Wirkung in dieser Probe durch Zugabe von 5 µl 0.1m EDTA, pH 8.0, unterbunden und der Grad der Umwandlung durch analytische Bandsedimentation in einem alkalischen Cäsiumchloridgradienten in der Spinco Model-E Zentrifuge untersucht. Für den Cäsiumchlorid-Sedimentationsgradienten werden 3.42 g Cäsiumchlorid ("Suprapur", Merck) in 6.58 ml Wasser gelöst und von dieser Lösung 1.8 ml mit 0.2 ml 1n Natronlauge auf pH 13 gebracht. Die Sedimentation erfolgt in der kleinen analytischen Zelle mit Kel F Centrepiece im AnD-Rotor bei 25 980 upm, 20°C. Alle acht Minuten werden mit der UV-Optik Aufnahmen mit 20 Sekunden Belichtungszeit gemacht.

Wenn der angestrebte Umwandlungsgrad noch nicht erreicht ist, wird der Ansatz wieder aufgetaut und bei 20°C weiter inkubiert. Wenn ungefähr ein Drittel der RF I in der Position einzelsträngiger DNS erscheint (Abb. 1), wird der Gesamtansatz in Gegenwart einer genügenden Menge 0.1 molarer EDTA-Lösung aufgetaut, daß die Magnesiumionen im Ansatz chelatisiert werden und weitere DNase-Einwirkung unterbleibt. Er wird mit B/4-Puffer (C 2) auf das zehnfache Volumen verdünnt, auf pH 13 gebracht und nach 10 Minuten rasch neutralisiert. Anschließend werden die Nukleinsäuren gegen 2xSSC (C 2) ausdialysiert.

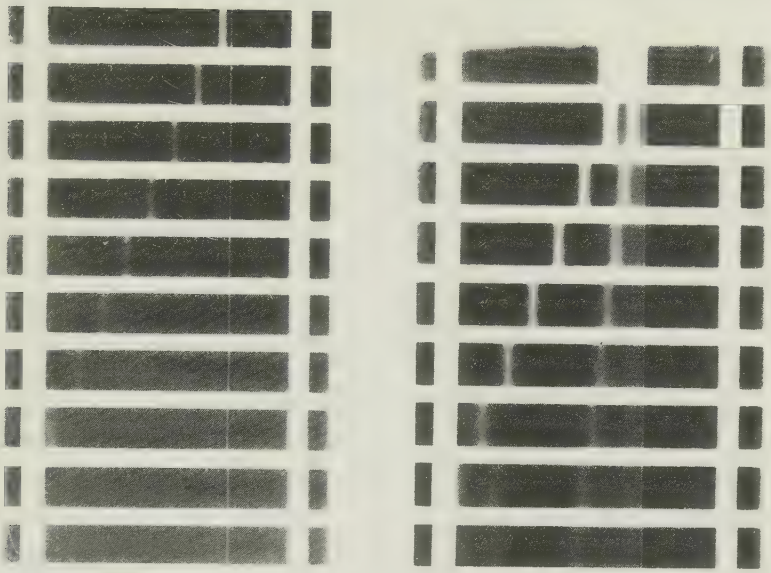

Abb. 1: Analytische Bandsedimentation in alkalischer Cäsiumchloridlösung von M13 RF I vor DNase-Behandlung (linke Abbildung) und nach ungefähr dreißigprozentiger Umwandlung in RF II (rechte Abbildung). Die Sedimentation wurde in der analytischen Ultrazentrifuge (Spinco Model E) im AnD-Rotor bei 25 980 upm und +20°C vorgenommen. Alle 8 Minuten wurden mit der UV-Optik Aufnahmen von 20 Sekunden Belichtungsdauer gemacht.

10.2 Hitzeumwandlung (Methode b)

Die unverdünnte DNS-Lösung in B/4-Puffer (C 2) wird 25 Minuten auf 100°C im siedenden Wasserbad erhitzt und rasch in einen eisgekühlten 250 ml-Erlenmeyerkolben geschüttet. Eine 5 µl Probe wird entnommen, auf das zehnfache in B/4-Puffer verdünnt und auf ihren Umwandlungsgrad in der analytischen Ultrazentrifuge wie oben beschrieben untersucht. Bei 60 prozentiger Umwandlung wird der Ansatz in 2xSSC (C 2) verdünnt.

10.3 Beladen der Hybridisationsfilter mit denaturierter RF II-DNS

Zellulosenitratfilter (Sartorius, Göttingen; Porenweite 0.45 µ) werden nach der von Gillespie und Spiegelman (1965) beschriebenen Methode mit der einzelsträngigen DNS beladen. Beide DNS-Ansätze (C 10.1 und 10.2) werden mit 2xSSC (C 2) auf eine Konzentration von 0.2 µg DNS/ml gebracht. Die Filtrationsgeschwindigkeit wird auf 10 ml/min eingestellt. 10 ml 2xSSC werden durch die in 2xSSC mindestens eine Minute inkubierten Filter gesaugt, dann die DNS-Lösung und weitere 10 ml 2xSSC zum Nachspülen. Die zum Beladen der Filter jeweils verwendete DNS-Menge ist in den Legenden der Abbildungen angegeben. Die Filter werden erst zwei Stunden bei Raumtemperatur, dann mindestens zwei Stunden bei 75°C getrocknet und im Vakuumexsikkator über Phosphorpentoxid aufbewahrt.

Die Retention der DNS auf den Filtern wurde durch Zugabe von ^{32}P-M13 Einzelstrang-DNS (C 8.1) vor Beladen und Messen der ^{32}P-Radioaktivität nach Hybridisation (C 16) kontrolliert. Gemittelt über 20 Proben ergab sich eine Streuung von lediglich ungefähr 20% um den Mittelwert.

11 Beladen der Hybridisationsfilter mit (+)-Strang DNS

Die nach C 7 hergestellten M13-Phagen werden phenolisiert (vergl. C 8.1). Die in der wässrigen Phase enthaltene DNS wird mit Äthanol präzipitiert und in 2xSSC aufgenommen. Nach Konzentrationsbestimmung im Zeiss Spektralphotometer (36 µg ≙ 1 $E^{1\ cm}_{260}$, Sinsheimer 1966) wird auf 0.2 µg/ml in 2xSSC verdünnt. Mit dieser (+)-Strang Präparation werden Hybridisationsfilter wie unter C 10.3 beschrieben hergestellt.

12 Markierung und Präparation von Nukleinsäuren aus uninfizierten und M13 infizierten Zellen

12.1 Langzeitmarkierungen

12.1.1 Nukleinsäuren aus infizierten Zellen

E. coli AB 301 Zellen werden in M9-Medium (C 2) bis $2x10^8$ Zellen/ml bei 37°C gezogen und mit einer Multiplizität von 20 mit M13 infiziert. Nach 30 Minuten wird die Kultur auf 2 µg/ml Uridin und 2 µCi/ml ^{3}H-Uracil (16.5 Ci/mMol, Amersham England) gebracht, nach weiteren 10 Minuten (40 min nach Infektion) in ein Eisbad gestellt und durch Zugabe von Würfeleis rasch abgekühlt. Die Zellen werden jetzt abzentrifugiert, in 1/20 des ursprünglichen Kulturvolumens in STE-Puffer (C 2) aufgenommen, 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 1% SDS lysiert und dreimal mit STE-äquilibriertem Phenol phenolisiert.

12.1.2 Nukleinsäuren aus uninfizierten Zellen

E. coli AB 301 Zellen werden wie unter C 12.1.1 beschrieben bei 37°C bis $2x10^8$ Zellen/ml gezogen und nach weiteren 30 Minuten mit ^{3}H-Uracil markiert und aufgearbeitet.

12.2 Pulsmarkierungen und "Puls-Chase" Experiment

12.2.1 Pulsmarkierung zur Charakterisierung der M13 Messenger RNS in Saccharosedichtegradienten

Für eine angenäherte Größenbestimmung der M13 Messenger RNS durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation (D 2.1 u. 2.2) wird eine Kultur wie unter C 12.1.1 beschrieben gezogen und infiziert, aber statt dreißig Minuten nur eine Minute pulsmarkiert (2 µCi/ml ^{3}H-Uracil). Der Puls wird von 30 bis 31 min nach Infektion gegeben und sofort danach durch Über-

schütten der Kultur auf dasselbe Volumen geeisten Mediums beendet. Parallel wird zur selben Zeit eine uninfizierte Kultur eine Minute radioaktiv markiert.

12.2.2 Pulsmarkierung zur Bestimmung der Synthesekinetik der M13 spezifischen Messenger RNS

Bei dem unter D 2.2.3 und 2.2.4 beschriebenen Experiment werden E. coli AB 301 Zellen in H-Medium (C 2, 10^{-3}m Phosphat) bis 1.5×10^{8} Zellen/ml bei 37°C gezogen, auf 300 µg/ml Desoxyadenosin (Budman u. Pardee, 1967) und 100 µg/ml Thymin gebracht und zehn Minuten später mit einer Multiplizität von 20-40 mit M13 infiziert. Bei 1, 26, 56 und 116 Minuten nach Infektion werden der Hauptkultur 20 ml Proben entnommen, die auf 1 µg/ml Uracil gebracht und gesondert weiter belüftet werden. Jeweils 4 Minuten später (bei 5, 30, 60 und 120 min nach Infektion) erhält jede Probe einen 5 Minuten Puls von 40 µCi/ml ^{3}H-Uracil (28.3 Ci/mMol). Am Ende des Pulses wird die Probe auf Eis-Azid Puffer (C 2) gegossen, um den weiteren Einbau von ^{3}H-Uracil zu unterbinden.

12.2.3 "Puls-Chase" Experiment

Bei dem unter D 3 beschriebenen "Puls-Chase" Experiment wird eine Kultur E. coli AB 301 wie oben beschrieben gezogen, auf 300 µg/ml Desoxyadenosin und 100 µg/ml Thymin gebracht und infiziert. 15 Minuten nach Infektion wird Uracil (1 µg/ml) und 20 min nach Infektion ^{3}H-Uracil (40 µCi/ml) zugegeben. Drei Minuten später (23 min nach Infektion) werden 20 ml der Kultur auf Eis-Azid Puffer (C 2) gegossen und gleichzeitig der Rest der pulsmarkierten Kultur auf 250 µg/ml Uracil und 250 µg/ml Uridin gebracht ("Chase"), um weitere Inkorporation von radioaktivem Uracil in die RNS zu unterbinden. Nach weiteren 1.5, 4, 8 bzw. 20 min werden der

Kultur 20 ml Proben entnommen und wie oben beschrieben auf Eis-Azid Puffer gegossen.

Die Zellen werden 30 Minuten bei 8 000 upm und +2°C in der MSE Highspeed-18 Zentrifuge abzentrifugiert, zweimal in der Kälte mit Azid-Waschpuffer (C 2) gewaschen, in je 2 ml Tris-KCl-EDTA Puffer (C 2) resuspendiert, 3 Minuten in 1% SDS bei Eisbadtemperatur lysiert und dreimal mit Tris-KCl-EDTA Puffer äquilibriertem Phenol phenolisiert. Nach Alkoholfällung werden die Proben jeweils in 0.5 ml 0.01m Tris, pH 7.8, 1% SDS, 10^{-3}m EDTA aufgenommen.

Zu jeder pulsmarkierten Probe (C 12.2.2 u. 12.2.3) werden vor dem ersten Zentrifugationsschritt 2 ml uninfizierte Zellen, die in H-Medium ($5x10^{-4}$m Phosphat, C 2) bei einer Zelldichte von $1.5x10^{8}$/ml für drei Generationen mit 30 µCi/ml ^{32}P-Phosphat markiert worden waren, als interner Standard zugegeben, um die unvermeidlich auftretenden schwankenden Verluste bei den darauf folgenden Aufarbeitungsschritten später rechnerisch ausgleichen zu können.

12.2.4 Pulsmarkierungen zur Aggregationskontrolle

Bei den unter D 4 beschriebenen Aggregationskontrollen werden E. coli AB 301 Bakterien wie unter C 12.2.2 beschrieben gezogen, infiziert und von 30-35 bzw. 60-65 min nach Infektion mit 100 µCi/ml ^{3}H-Uracil markiert. Die Aufarbeitung erfolgt nach dem oben beschriebenen Schema. Nach Alkoholfällung werden die Proben in 1 ml 0.1m Tris, pH 7.8, 10^{-3}m EDTA ohne SDS bei 0°C aufgenommen.

13 Chromatographie auf Zellulosesäulen

Die nach C 12.1 und 12.2.1 aufgearbeiteten Nukleinsäuren in STE-Puffer (C 2) werden mit absolutem Äthanol auf 35% (v/v) Äthanol gebracht, entlüftet und zur Entfernung der bei der

Hybridisation störenden DNS auf einer Zellulosesäule (Franklin 1966) chromatographiert. Die 15% Äthanolfraktion, welche ribosomale RNS, Messenger RNS und einzelsträngige DNS enthält, wird gesammelt, rechromatographiert, alkoholgefällt und in 2xSSC Puffer (C 2, D 1), bzw. für eine spätere Charakterisierung durch Sedimentation im Saccharosedichtegradienten in Tris-KCl-EDTA Puffer aufgenommen (C 2, D 2.1).

14 Bandsedimentation in Saccharosedichtegradienten

Für eine angenäherte Größencharakterisierung werden die Nukleinsäuren nach C 13 auf einen 5-20% Saccharosegradienten in Tris-KCl-EDTA Puffer (C 2) gegeben, wobei von den Nukleinsäuren aus infizierten Zellen 830 µg in 1 ml Tris-KCl-EDTA Puffer (Gradient 1), von den uninfizierten (Gradient 2) 220 µg in 1 ml auf einen 29 ml Gradienten geschichtet werden. Nach Auftrennung der Nukleinsäuren in einem SW 25/1 Rotor (16.5 Stunden bei 24 000 upm, 4°C) werden die Gradienten durch Abtropfen aus einer 2er-Kanüle in Röhrchen fraktioniert, welche 1 ml 2xSSC und 0.2 ml 10xSSC (Gradient 1) bzw. 0.2 ml 10xSSC (Gradient 2) enthalten. 0.05 ml jeder Fraktion werden nach C 6.1 auf ihre Radioaktivität ausgemessen. Um die Positionen der 23s und 16s ribosomalen RNS als Sedimentationsstandards eindeutig aufzufinden, wird außerdem die Extinktion jeder Fraktion im Zeiss Spektrophotometer bei 260 mµ bestimmt. 1 ml jeder Fraktion wird zur Prüfung auf ihren Gehalt an M13 spezifischer Messenger RNS mit RF-Filtern (C 10.3) 19 Stunden lang hybridisiert (C 16).

15 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Elektrophorese werden 2.4 und 3.0 prozentige Polyacrylamidgele verwendet. 2.4 prozentige Acrylamidgele werden folgendermaßen hergestellt (Bishop, Claybrook u. Spiegelman,

1967): 4 ml einer 15% Acrylamid, 0.75% Methylenbisacrylamid enthaltenden Lösung werden mit 12.45 ml deionisiertem Wasser und 8.33 ml Puffer 3E (C 2) gemischt und in einer Saugflasche entlüftet. Nun werden 0.02 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin und 0.2 ml einer frisch angesetzten 10 prozentigen Lösung von Ammoniumperoxodisulfat dazugegeben. Unmittelbar darauf wird die Mischung in Plexiglasröhrchen mit einer lichten Weite von 0.7 cm gegeben, die unten mit "Parafilm" verschlossen sind. Nach 20 Minuten Polymerisationszeit werden die Gele nach Abziehen des Parafilms in eine große verschließbare Glasschale mit Puffer E (C 2) überführt und dort zum Quellen mindestens 72 Stunden belassen.

Das für die Herstellung der Gele verwendete Acrylamid (Fluka) wird aus Chloroform, das Methylenbisacrylamid (Röhm u. Haas) aus Aceton umkristallisiert (Loening 1967).

Zu einer Elektrophorese wird ein Gel in ein Plexiglasröhrchen gesaugt und auf 5 cm zurechtgeschnitten. Das Röhrchen wird an der Unterseite mit Dialyseschlauch verschlossen, der zuvor in einer EDTA-Lösung (0.4%) ausgekocht worden war. Vor Auftragen der Substanz in Puffer E, der für die Probe 10% RNase-freie Saccharose (Mann Research) enthält, wird das Gel 30 Minuten mit einer Stromstärke von 5 mA pro Gel vorelektrophoretisiert. Die Probe (0.1 ml) wird unter Spannung aufgegeben und 75 Minuten aufgetrennt (5 mA/Gel). Nach Beendigung des Laufs wird das Gel aus dem Röhrchen herausgelöst, in einer Plexiglasrinne auf einem Aluminiumblock im Trockeneis/Alkohol-Bad eingefroren und auf einem mit Trockeneis gekühlten Mikrotom in 1 mm Scheiben geschnitten. Die Scheiben werden über Nacht mit 1 ml 2xSSC, 0.5% SDS ausgeschüttelt, und ein Aliquot von 0.1 ml wird auf TCA-fällbare Radioaktivität ausgetestet (C 6.1). Die extrahierte RNS wird mit 0.6 µg denaturierter M13 RF II pro Fraktion 19 Stunden bei 66°C hybridisiert.

Dreiprozentige Acrylamidgele enthalten als Quervernetzer statt Methylenbisacrylamid 0.2% Äthylendiacrylat (Serva, Heidelberg), der auf Grund seiner Alkalilabilität (Choules u. Zimm, 1965) erlaubt, die Gelscheiben bei analytischen Läufen in Piperidin-Hyaminhydroxid aufzulösen und direkt ohne die umständlichere Elution auf ihre Radioaktivität auszuzählen (C 6.4). Die dreiprozentigen Acrylamidgele werden nach dem Gießen (0.7 cm x 7 cm Gele) vorsichtig mit Wasser überschichtet und zum Polymerisieren mindestens zwei Stunden stehengelassen. Die Gele bleiben in den Plexiglasröhrchen; der Parafilm wird durch ausgekochten Dialyseschlauch ersetzt und eine halbstündige Vorelektrophorese in Puffer E durchgeführt. Nach Aufgeben der Substanz (im allgemeinen 0.1 ml) und Elektrophorese mit 5 mA/Gel für 120-150 min wird das Gel eingefroren und in 2 mm Scheiben geschnitten. Bei präparativen Läufen für anschließende Hybridisation werden die Gelscheiben mindestens 12 Stunden mit je 2 ml 2xSSC, 0.5% SDS in sterilen Szintillationsröhrchen geschüttelt, vom Eluat 0.08 ml TCA-gefällt (C 6.1) und 1.6 ml hybridisiert (C 16). Bei analytischen Läufen werden die Gelscheiben direkt in Piperidin-Hyaminhydroxid gelöst und in Kinard's Reagens gezählt (C 6.4).

16 Hybridisation und RNase-Verdau

Hybridisationen werden entsprechend dem von Gillespie und Spiegelman (1965) beschriebenen Verfahren durchgeführt außer bei vorhergehenden Dimethylsulfoxidgradienten. Proben in 2xSSC, 0.5% SDS-Lösung werden mit jeweils einem DNS-beladenen Filter (C 10 u. 11) bei 66°C in sterilen Schraubröhrchen in einem Brutschrank inkubiert. Das Probevolumen, die zur Hybridisation verwendete DNS-Menge und die Inkubationszeit sind in den Legenden der Abbildungen

angegeben. Nach raschem Abkühlen der Proben werden die Filter mit einer Pinzette entnommen, von beiden Seiten mit je 50 ml 2xSSC gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 ml 2xSSC mit 20 µg/ml RNase I-A inkubiert. Die RNase (Sigma) wird zuvor in einer Konzentration von 2 mg/ml in 0.05m Natriumzitrat, pH 5.2, zehn Minuten auf 85°C erhitzt, um etwa vorhandene DNase-Aktivität zu zerstören. Nach dem RNase-Verdau werden die Filter wiederum von beiden Seiten mit 50 ml 2xSSC gewaschen, getrocknet und auf ihre Radioaktivität gemessen (C 6.2).

Nach Dimethylsulfoxidgradienten wird in Lösung homogen hybridisiert (Warnaar, de Mol, Mulder, Abrahams u. Cohen, 1970). Zu jeder Fraktion des Gradienten (0.1 ml) werden 2 ml steriler 4xSSC Puffer (C 2) und 2 µg denaturierte M13 RF II-DNS gegeben. Nach Entnahme von 0.1 ml-Proben zur Radioaktivitätsbestimmung (C 6.1) werden die Nukleinsäuren 20 Stunden bei 50°C hybridisiert. Nach langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur werden je Fraktion 2 ml steriles Wasser und 1 ml 2xSSC mit 100 µg DNase-freier RNase zugegeben, um auf ein Volumen von 5 ml und eine Endkonzentration von 2xSSC und 20 µg/ml RNase zu kommen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben in ein Eisbad gestellt, und zu jeder Probe werden 0.625 ml 20xSSC (C 2) gegeben, um die Salzkonzentration auf 4xSSC zu erhöhen und damit weitere RNase-Wirkung zu verhindern. Dann werden die Proben über Zellulosenitratfilter mit 0.45 µ Porenweite (Sartorius, Göttingen) filtriert und die Filter mit jeweils 100 ml 4xSSC gewaschen. Die Filter werden getrocknet und auf ihre Radioaktivität gemessen.

17 Alkalihydrolyse nach Gelelektrophorese

Das Eluat der einzelnen Gelscheiben wird bei 0°C auf 0.25m Kalilauge gebracht und unterteilt. Ein Aliquot wird unmit-

telbar darauf zu einer äquivalenten Menge Salzsäure pipettiert und TCA-gefällt, der Rest eine Stunde bei 45°C inkubiert und dann ein gleichgroßes Aliquot wie oben neutralisiert und gefällt.

18 Bandsedimentation in Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten

Dimethylsulfoxidgradienten (D 4.2) werden durch Mischen der Dimethylsulfoxidlösungen 1 und 2 hergestellt. Lösung 1 ist 10% (w/v) Saccharose (RNase-frei) in Hexadeuterodimethylsulfoxid (99% deuteriert, Merck: "Für die Spektroskopie"). Lösung 2 ist 10% (v/v) Hexadeuterodimethylsulfoxid in Dimethylsulfoxid (Merck: "Für die Gaschromatographie"). Beide Lösungen enthalten 10^{-3} mMol/ml EDTA (durch 1:100 Verdünnung von 0.1m EDTA, pH 7.0, hergestellt). Die Lösungen werden unter Stickstoff angesetzt. Die 10 prozentige Saccharoselösung wird durch Erwärmen in einem mit "Parafilm"luftdicht verschlossenen Gefäß im Wasserbad bei 80°C hergestellt.

Die Gradienten werden aufsteigend in Polyallomerröhrchen gefüllt. Die Proben (10 µl) werden mit 10 µl Dimethylformamid ("Für die Spektroskopie") und 180 µl Dimethylsulfoxid ("Für die Gaschromatographie") gemischt und auf 4 ml (5 ml) Gradienten geschichtet. Die Gradienten werden im Spinco SW 56 Ti-Rotor (SW 50.1 Rotor) zentrifugiert. Die Zentrifugationsdauer und Umdrehungszahl sind bei den Abbildungen angegeben.

19 Aggregationskontrolle durch kurzzeitige Titration auf pH 3

0.1 ml der Probe in 0.1m Tris, pH 7.8, 10^{-3}m EDTA (C 12.2.4) werden mit 0.8 ml sterilem Wasser und 0.01 ml 20% SDS ver-

dünnt, unter Rühren mit einem kleinen Magnetrührstab mit 0.04 ml n/10 Salzsäure auf pH 3 gebracht und nach 30 Sekunden mit 0.03 ml 0.2m EDTA, pH 8.0, auf pH 6.8-6.9 zurücktitriert. 0.1 ml werden durch Zugabe fester Saccharose (Mann Research) auf 10% Saccharose gebracht und unmittelbar darauf gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine Kontrollprobe erhält zuerst EDTA, dann n/10 Salzsäure.

D. Experimentelle Ergebnisse und Diskussion

1 Matrizenfunktion des (-)-Stranges der M13 RF für die phagenspezifische Transkription

Während z.B. bei den großen T-Phagen nach Infektion der Transkriptionsmechanismus der Wirtszelle auf phagenspezifische Transkription umgeschaltet wird und deshalb die phagenspezifische Messenger RNS bereits durch radioaktive Markierung nach Infektion nachzuweisen ist (Volkin u. Astrachan, 1956; Astrachan u. Volkin, 1958; Nomura, Hall u. Spiegelman, 1960; Brenner, Jacob u. Meselson, 1961; Hall u. Spiegelman, 1961), tritt dieser Vorgang bei den kleinen einsträngigen DNS-Phagen nicht ein (Rueckert u. Zillig, 1962; Hayashi, Hayashi u. Spiegelman, 1963a; Hoffmann-Berling u. Mazé, 1964; Salivar, Tzagoloff u. Pratt, 1964; Lindqvist u. Sinsheimer, 1967). Die experimentellen Schwierigkeiten bei der Untersuchung der Messenger RNS Synthese, die von den kleinen einsträngigen DNS-Phagen gesteuert wird, werden dadurch noch größer, daß die nach Infektion gebildete phagenspezifische Messenger RNS außerdem in ihrer Basenzusammensetzung nicht von der Wirts-Messenger RNS abweicht und deshalb nicht ohne weiteres z.B. durch Chromatographie von ihr abgetrennt werden kann (Hayashi, Hayashi u. Spiegelman, 1963a). Daher wird zu ihrem Nachweis und zu ihrer Isolierung in erster Linie die Hybridisation der phagenspezifischen Messenger RNS mit der ihr basenkomplementären DNS-Matrize (Hall u. Spiegelman, 1961) angewendet.

Die Untersuchungen über die Messenger RNS Synthese in T-phageninfizierten Zellen konnten davon ausgehen, daß die Phagen-DNS, an der die phagenspezifische Transkription abläuft, doppelsträngig ist und orientierten sich an der Fragestellung, ob die Transkription an dieser doppelsträngigen Matrize symmetrisch oder asymmetrisch erfolgt, d.h.

ob die Messenger RNS Synthese gleichzeitig an beiden DNS-Strängen verläuft oder nur an einem. Die Basenzusammensetzung unfraktionierter T_2-Messenger RNS (Volkin u. Astrachan, 1956; Nomura, Hall u. Spiegelman, 1960) und von T_4-Messenger RNS nach Hybridisation an DNS auf Säulen (Bautz u. Hall, 1962; Bolton u. McCarthy, 1962) ließen auf Grund ihres von eins stark abweichenden G:C Verhältnisses darauf schließen, daß in vivo zumindest die phagenspezifische Transkription asymmetrisch verläuft (vergl. auch Marmur u. Greenspan, 1963; Tocchini-Valentini, Stodolsky, Aurisicchio, Sarnat, Graziosi, Weiss u. Geiduschek, 1963), wobei als Voraussetzung für diesen Schluß die beiden DNS-Stränge der Matrize ein ungleiches G:C Verhältnis aufweisen mußten. Die Verallgemeinerung des Befundes auf die Transkriptionsasymmetrie in Bakterien erlaubten Untersuchungen über das Basenverhältnis ribosomaler und Transfer-RNS sowie die Suppression bestimmter rII-Mutanten des Phagen T_4 durch 5-Fluoruracil (siehe Hayashi, Hayashi u. Spiegelman, 1963a).

Diese Untersuchungen gingen davon aus, daß in vivo generell doppelsträngige DNS gefunden wird, die deshalb als Matrize für den Transkriptionsprozeß dienen muß. Für die Transkription an doppelsträngiger DNS wurde - wie oben ausgeführt - gezeigt, daß sie asymmetrisch verläuft, wobei ein der Transkription vorgeschalteter Mechanismus den für die Transkription schließlich verwendeten DNS-Strang oder DNS-Bereich auswählen muß.

Der allgemeinen Gültigkeit dieses Modells schien der Befund zu widersprechen, daß z.B. im Phagen ØX 174 eine einsträngige DNS auftritt, die in die infizierte Zelle gelangt und möglicherweise zur Transkription in Messenger RNS benutzt werden könnte. Es ließ scih jedoch zeigen, daß die einsträngige DNS des Phagen innerhalb der ersten drei Minuten nach Infektion in der Zelle in eine doppelsträngige DNS ("Repli-

kative Form") umgewandelt wird (Sinsheimer, Starman, Nagler u. Guthrie, 1962), die als doppelsträngige Matrize für die Synthese von Messenger RNS dienen könnte.

Hayashi und Mitarbeiter (Hayashi, Hayashi u. Spiegelman, 1963a) isolierten die RNS aus ØX 174 infizierten Zellen und charakterisierten sie durch Hybridisation mit phagenspezifischer DNS, wobei sie sich den Umstand zunutze machten, daß im Phagen nur ein DNS-Strang, der (+)-Strang, in der RF-DNS aber außerdem der basenkomplementäre "(-)-Strang" auftritt. Nach Vorreinigung der RNS durch Chromatographie über Säulen mit Kieselguhr, der mit methanolverestertem Serumalbumin imprägniert war, hybridisierten sie die RNS einmal mit ØX RF, zum anderen mit Phageneinzelstrang und fanden, da die phagenspezifische RNS nur mit RF hybridisierte, daß sie basenkomplementär zum (-)-Strang und deshalb homolog zum (+)-Strang sein muß.

Daß ØX (+)-Strang und ØX Messenger RNS einander homolog sind, wurde in vitro von Siegel und Hayashi (1967) bestätigt. Sie synthetisierten an ØX RF RNS und fanden, daß sie nur mit isoliertem (-)-Strang, nicht dagegen mit reinem (+)-Strang hybridisierte.

Mit einer unabhängigen, sehr eleganten Methode zeigten Vanderbilt und Tessman (1970) für den Phagen S13, der mit ØX 174 eng verwandt ist, daß die Gene I (Hüllprotein), II (Kapsidkomponente), IIIa und b (Spikekomponenten), IV (Tochter-RF Synthese) und VI vom (-)-Strang der RF-DNS transkribiert werden. Die Autoren studierten dazu hydroxylamininduzierte Mutanten und versuchten, aus Wildtypphagen (Methode a) bzw. aus amber- und opal(UGA)-Mutanten (Methode b) ochre-Mutanten herzustellen, wobei die einzelnen Mutanten durch ihre Plattierungseffizienz auf bestimmten Wirtsstämmen differenziert wurden. Methode a sollte erfolgreich sein, wenn (+)-Strang und Messenger RNS homolog, Methode b, wenn (+)-Strang und Messenger RNS komplementär

sind. Während mit dieser Methodik eindeutig für die oben erwähnten Gene gezeigt werden konnte, daß sie vom (-)-Strang transkribiert werden, versagten beide für die Gene V und VII, so daß für sie keine Bestätigung der Hybridisationsergebnisse möglich war.

Während mit den bisher erwähnten experimentellen Ansätzen lediglich die Homologie zwischen (+)-Strang und Messenger RNS gezeigt wurde, sprechen die folgenden Befunde für die direkte Beteiligung der RF-DNS an der Transkription in vivo: Wird die DNS-Synthese der infizierten Bakterienzellen zu verschiedenen Zeiten vor oder nach Infektion durch 5-Fluordesoxyuridin (Cohen, Flaks, Barner, Loeb u. Lichtenstein, 1958) blockiert und die Bildung des lytischen Prinzips (Gen 1) bei ØX 174 gemessen, so findet bei einer Blockierung vor Infektion und innerhalb der ersten fünf Minuten nach Infektion keine phagenspezifische Proteinsynthese statt, auch wenn durch hohe Uracilgaben die RNS-Synthese erlaubt wird. Durch 5-Fluordesoxyuridin wird offensichtlich die RF-Synthese gehemmt. Dadurch kann die phagenspezifische Proteinsynthese blockiert werden (Markert u. Zillig, 1965). Die Transkription muß also an der RF-DNS oder einer ihr folgenden DNS-Form ablaufen. Die Blockierung der Proteinsynthese durch Hemmung der RF-Synthese tritt jedoch voll nur zu früher Zeit nach Infektion (innerhalb der ersten fünf Minuten) ein. Der Vergleich mit den Ergebnissen von Sinsheimer und Mitarbeitern (Sinsheimer, Starman, Nagler u. Guthrie, 1962), daß die Bildung der ersten doppelsträngigen RF-Moleküle aus dem infizierenden Einzelstrang innerhalb der ersten drei Minuten nach Infektion stattfindet, legt den Schluß nahe, daß durch 5-Fluordesoxyuridin die Bildung der parentalen RF inhibiert wird. Erst wenn zumindest die parentale RF (oder weitere RF-DNS) gebildet wird, könnte die phagenspezifische Transkription anlaufen. Verstärkt wird diese Vermutung durch den Befund, daß Mar-

kert und Zillig (1965) keinen vergleichbaren Effekt von 5-Fluordesoxyuridin auf die Lysefunktion bei dem Phagen T_1 erzielen konnten, bei dem bereits im Phagen eine doppelsträngige DNS vorliegt. Damit wurde gezeigt, daß RF-Synthese für die phagenspezifische RNS-Synthese bei ØX 174 notwendig ist.

Eine genauere Einordnung, wann die phagenspezifische Transkription erfolgt, gestatten die folgenden Experimente: Wird die DNS-Synthese erlaubt, dafür aber die Proteinsynthese in den Wirtszellen bei Infektion durch Chloramphenicol gehemmt, wird die infizierende DNS in die RF-DNS umgewandelt (Sinsheimer, Starman, Nagler u. Guthrie, 1962; Hayashi, Hayashi u. Spiegelman, 1963b), selbst bei 100 µg/ml (Tessman 1966), einer Konzentration, bei der die Synthese von Tochter-RF unterbleibt. Das erste Molekül Replikative-Form DNS wird offenbar also durch ein bereits vor der Infektion gebildetes Wirtsenzym synthetisiert. Dieser Schluß läßt sich auch aus dem Befund ableiten, daß die Bildung des ersten Moleküls RF in der Zelle (der parentalen RF) im suppressornegativen Wirt bei allen bekannten bedingten Letalmutanten des Phagen vollzogen wird (Tessman 1966). Der infizierende (+)-Strang wird also von einem Wirtsenzym "wegtitriert" und in doppelsträngige DNS umgewandelt. Bis zu diesem Schritt ist keine phagenspezifische Proteinsynthese erfolgt. Sie wird erst für die nun folgende Synthese von Tochter-RF benötigt. Die phagenspezifische Proteinsynthese und die dafür notwendige Transkription müssen deshalb nach Bildung der parentalen RF und vor der Synthese von Tochter-RF ablaufen.

Dieser Schluß wird noch durch einen weiteren Befund gestützt: In Mitomycin behandelten hcr^+-Zellen, die mit ØX 174 infiziert worden sind, kommen Wirts-DNS Synthese und Phagenvermehrung zum Stillstand. Die parentale RF wird jedoch gebildet. Sie genügt offensichtlich als Matrize für die phagen-

spezifische Transkription, denn man beobachtet, daß die Zellen nach der für eine ØX-Infektion charakteristischen Zeit lysieren (Sinsheimer 1968).

Die oben aufgeführten Experimente haben gezeigt, daß für den Phagen ØX 174 nicht nur eine Basenkomplementarität zwischen Messenger RNS und (-)-Strang der RF besteht, sondern daß die RF-DNS unmittelbar am Transkriptionsprozeß beteiligt ist. Für diese Aufgabe reichen anscheinend einige wenige RF-Moleküle je Zelle aus, vielleicht bereits die parentale RF.

Einen unmittelbaren Hinweis auf die Beteiligung der RF an der Transkription liefert schließlich der folgende Befund: Bei der Transkription von ØX RF beobachtet man in vitro einen Komplex, in dem ØX RF und RNS über ungefähr fünfzig Nukleotidpaare verbunden sind (Hayashi 1965) und in dem die RNS in 5', 3'-Richtung synthetisiert wird (Tonegawa u. Hayashi, 1966). Ein solcher Komplex wird auch in vivo in ØX infizierten Zellen nach Deproteinisieren, RNase-Verdau und Säulenchromatographie gefunden. Alle angeführten Befunde führen bei ØX 174 zu dem Schluß, daß der (-)-Strang der RF unmittelbar als Matrize für die phagenspezifische Messenger RNS dient.

Für die fd-artigen Phagen finden sich manche Hinweise, welche vermuten lassen, daß nicht der infizierende (+)-Strang, sondern eine wie bei ØX 174 intrazellulär gebildete RF-DNS (Ray, Bscheider u. Hofschneider, 1966; Ray, Preuss u. Hofschneider, 1966) zur phagenspezifischen Transkription herangezogen wird. Denn auch hier wird der (+)-Strang selbst bei hoher Chloramphenicolkonzentration und bei allen bekannten amber-Mutanten im nichtpermessiven Wirt in die doppelsträngige RF-DNS umgewandelt (Pratt u. Erdahl, 1968). Die Bildung des ersten RF-Moleküls in einer infizierten Zelle wird demnach nicht durch den Phagen gesteuert. Wie

bei ØX 174 wird der infizierende (+)-Strang wegtitriert. Die phagenspezifische Transkription muß deshalb an der RF-DNS erfolgen. Um nachzuweisen, welcher der beiden DNS-Stränge der M13 RF in vivo der phagenspezifischen Messenger RNS homolog ist, wurde die vergleichende Hybridisation von RNS aus infizierten Zellen mit denaturierter RF II (siehe C 9), die als (+),(-)-Strang Gemisch vorliegt, und (+)-Strang aus M13-Phagen gewählt.

1.1 Hybridisation der M13 spezifischen Messenger RNS mit M13 RF

Um die Homologie der M13 Messenger RNS mit dem (+)- oder (-)-Strang der M13 RF-DNS nachzuweisen, wurde von der folgenden Überlegung ausgegangen: Wenn die M13 Messenger RNS zum (+)-Strang komplementär ist, sollte, bezogen auf das Gewicht der zur Hybridisation eingesetzten DNS, denaturierte RF II 50% des Hybridisationswertes des reinen (+)-Stranges zeigen, da in diesem Fall der (-)-Strang nicht zur Hybridisation beiträgt. Wenn der (-)-Strang der komplementäre Strang ist, sollte die Hybridisation an reinem (+)-Strang lediglich durch die Höhe der nicht vollständig entfernbaren unspezifischen Radioaktivität gegeben sein. Bei einer symmetrischen Transkription, die aber nach den unter D 1 angeführten Überlegungen unwahrscheinlich ist, wäre für den (+)-Strang, bezogen auf das Gewicht der zur Hybridisation verwendeten DNS, nur 50% hybridisierte Radioaktivität im Vergleich zur denaturierten RF II zu erwarten.

Die Spezifität der Hybridisierungsreaktion muß durch ein Kontrollexperiment mit RNS aus uninfizierten Zellen nachgeprüft werden, um zu bestätigen, daß die Höhe der unspezifischen Radioaktivität, die bei der Hybridisation mitgeschleppt wird, vernachlässigbar klein ist und beim Hybridisationstest nur M13 spezifische Messenger RNS gemessen wird. Diese Kontrolle ist vor allem bei einer längeren

Markierungsdauer von Bedeutung, da hierbei der Hauptteil der Radioaktivität nicht in Messenger RNS sondern in stabile RNS (ribosomale und Transfer-RNS) eingebaut wird.

Zu welchem Strang der RF die M13 spezifische Messenger RNS auch immer homolog ist, es ist zu erwarten, daß denaturierte RF II mit RNS aus M13 infizierten Zellen hybridisiert. Die notwendigen Vorversuche wie DNS-Sättigung (D 1.2) und zeitliche Sättigung (D 1.3) wurden deshalb mit denaturierter RF II durchgeführt.

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß die M13 spezifische Messenger RNS daraufhin untersucht werden soll, ob ihre Synthese nur an einem der beiden Stränge der RF-DNS erfolgt, oder ein Teil der RNS dem einen, ein anderer Teil dagegen dem anderen DNS-Strang komplementär ist. Dieses Bild könnte sich dadurch noch komplizierter gestalten, daß die Strangspezifität der RNS im Sinn einer zeitlichen Regulation verändert wird. Um alle diese hier angesprochenen Möglichkeiten zu erfassen, wäre es denkbar, M13 infizierte Zellen zu verschiedenen Zeiten radioaktiv zu markieren und ihre RNS auf ihre Homologie mit dem (+)- oder (-)-Strang der M13 RF zu prüfen. In den weiter unten angeführten Experimenten D 1.2 - 1.4 wurde ein anderer Weg beschritten, der sich die für eine M13 Infektion charakteristische niedrige Adsorptionskonstante der Phagen zunutze machte. Die M13 Infektion mit einer Adsorptionskonstanten von nur $1x10^{-11}$ ml min^{-1} (Tzagoloff u. Pratt, 1964) verläuft so langsam, daß bei einem spezifischen Titer von 20 - 40 Phagen pro Bakterium erst nach fünfzig Minuten alle infizierbaren Zellen infiziert sind (siehe Abb. 10, D 2.2.3). Deshalb ist zu erwarten, daß 30 - 40 Minuten nach Infektion, also in dem Zeitintervall, in dem die infizierten Zellen für die Experimente D 1.2 - 1.4 radioaktiv markiert wurden, eine heterogene Population von M13 spezifischer Messenger RNS markiert wird. Ein Teil der Messenger RNS

wird aus Zellen stammen, bei denen die Infektion bereits lange etabliert ist, ein anderer aus einem früheren Infektionsstadium, der Rest schließlich aus frisch infizierten Zellen. Bei der Untersuchung wird also nicht eine besondere Klasse von M13 spezifischer Messenger RNS untersucht - sofern es überhaupt verschiedene Klassen bei dieser Messenger RNS gibt - sondern eine gemischte Population aus allen Stadien nach Infektion.

Für die Hybridisationsteste wurde die Membranfiltermethode (Gillespie u. Spiegelman, 1965; siehe C 10.1 und 10.3) verwendet. Die für die Hybridisation eingesetzten RNS-Präparationen wurden nach der von Franklin (1966) beschriebenen Methode auf einer Zellulosesäule chromatographiert, um die doppelsträngige DNS zu entfernen, die bei dem Hybridisationstest stören würde (C 13). Die verwendete Fraktion, die im Alkoholstufengradienten bei 15% Äthanol eluiert wird, enthält die ribosomalen RNS und Messenger RNS.

1.2 Bestimmung der DNS-Sättigung

Bei der Bestimmung, zu welchem Strang der RF die M13 spezifische Messenger RNS homolog ist, muß die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß der überwiegende Teil der Messenger RNS von dem einen Strang, eine Minorität jedoch vom Gegenstrang spezifiziert wird. Um auch diesen Anteil erfassen zu können, muß die Hybridisation im RNS-Überschuß durchgeführt werden. Die erforderliche Menge RNS, die für einen RNS-Überschuß mindestens notwendig ist, wird in einer DNS-Sättigungskurve ermittelt.

Wie Abbildung 2 zeigt beginnt bei einer eingegebenen RNS-Menge von 270 µg die Kurve abzuflachen: Die auf den Filtern fixierte DNS-Menge nähert sich bei der gewählten Hybridisationszeit ihrer Sättigung.

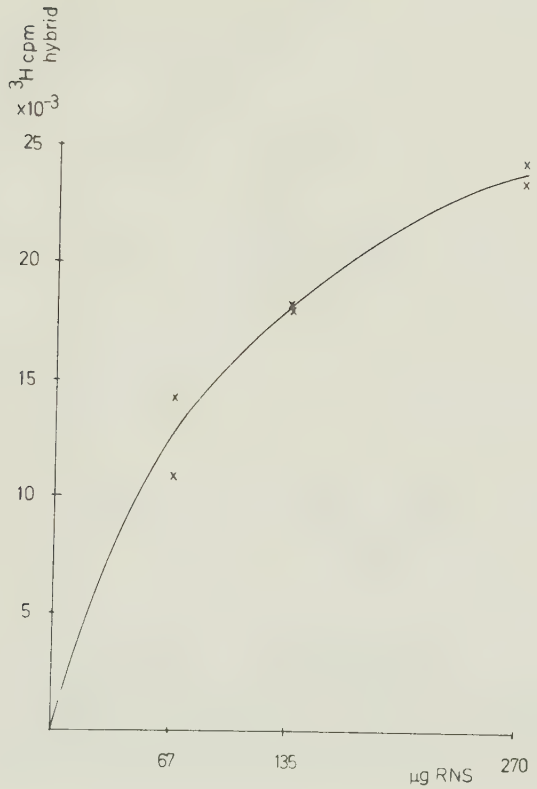

Abb. 2: DNS-Sättigungskurve für RNS aus M13 infizierten Zellen. RNS aus M13 infizierten Zellen, die von 30 bis 40 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil markiert worden waren, wurde in steigender Konzentration 4 Stunden mit 0.7 µg denaturierter M13 RF II-DNS/Filter in 2 ml 2xSSC bei 66°C hybridisiert. Aufarbeitung der RNS siehe C 12.1.1 und C 13; spezifische Radioaktivität: 7.4x10^3 cpm/µg RNS.

Es ist zu erwarten, daß die Form der DNS-Sättigungskurve und damit das Erreichen des Sättigungsplateaus mit steigender RNS-Konzentration auch von der Hybridisationsdauer abhängig ist. Bei niedriger RNS-Konzentration wird es länger dauern, bis alle oder der überwiegende Prozentsatz der hybridisierbaren RNS-Moleküle ihre Matrize gefunden haben und mit ihr Hybride bilden, da die Häufigkeit pro Zeiteinheit, gerade die richtige Sequenz auf der DNS zu finden, kleiner als bei einer höheren RNS-Konzentration und gleicher DNS-Menge ist. Deshalb ist es notwendig, für eine DNS-Sättigungskurve nach Bestimmung der minimalen zur DNS-Sättigung führenden RNS:DNS Relation mit einer niedrigeren RNS-Konzentration eine zeitliche Sättigungskurve aufzustellen. Die RNS-Konzentration, die zweckmäßigerweise für die zeitliche Sättigungskurve gewählt wird, ist ein Viertel derjenigen, die in Abb. 2 gerade noch zur DNS-Sättigung führt. Sie wird hier als "subminimale" RNS-Konzentration bezeichnet. Folgende Forderungen werden an sie gestellt: 1) Sie muß groß genug sein, um in einer experimentell vertretbaren Zeit zur zeitlichen Sättigung zu führen. 2) Sie muß klein genug sein, um auch bei langer Hybridisationszeit noch nicht zur DNS-Sättigung zu führen, denn andernfalls würde die eintretende DNS-Sättigung den Beginn der zeitlichen Sättigung vortäuschen und so zu einer Fehleinschätzung der zur DNS-Sättigung minimal notwendigen RNS-Menge führen.

1.3 Zeitliche Sättigung

Wenn für die in D 1.2 bestimmte "subminimale" RNS-Konzentration sich bei konstanter DNS-Menge auf dem Filter mit der Zeit die Menge der hybridisierten RNS nicht mehr ändert, ist der Eintritt der zeitlichen Sättigung gefunden. Für alle höheren RNS-Konzentrationen ist zu erwarten, daß bei ihnen die zeitliche Sättigung früher erreicht wird.

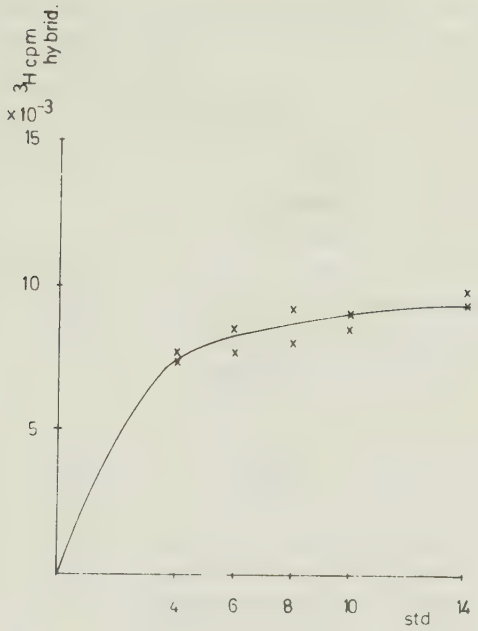

Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Hybridisation von RNS aus M13 infizierten Zellen mit M13 RF. 67 µg RNS aus M13 infizierten Zellen (Aufarbeitung und spezifische Radioaktivität wie in Abb. 2) wurden während der angegebenen Zeit mit 0.7 µg denaturierter M13 RF II/Filter in 2 ml 2xSSC bei 66°C hybridisiert.

Für dieses Experiment wurden Filter mit 0.7 µg denaturierter RF II wie in Abb. 2 verwendet. Die Filter wurden mit 67 µg RNS aus infizierten Zellen in 2 ml 2xSSC verschieden lange Zeit inkubiert und nach Waschen und RNase-Verdau (C 16) auf ihre Radioaktivität gemessen.

Wie die Abb. 3 zeigt, beginnt das Plateau der zeitlichen Sättigung für dieses System bei ungefähr sechs Stunden. Für die vergleichende Hybridisation von (+)-Strang und denaturierter RF II mit RNS aus M13 infizierten Zellen wurde eine Inkubationszeit von zehn Stunden gewählt.

1.4 Vergleichende Hybridisation von (+)-Strang und denaturierter RF II mit RNS aus infizierten Zellen

Für die Hybridisation von RNS aus infizierten Zellen mit denaturierter RF II wurde eine DNS-Sättigungskurve bei einer Inkubationszeit von zehn Stunden angelegt, die in Experiment D 1.3 für die in D 1.2 ausgewählte "subminimale" RNS-Konzentration als in der zeitlichen Sättigung liegend ermittelt wurde. Die Hybridisation mit (+)-Strang DNS wurde durch Parallelansätze bei der RNS-Konzentration ermittelt, bei der die Sättigungskurve für denaturierte RF II (siehe Abb. 4) bereits abzuflachen beginnt.

Die Hybridisation von M13 spezifischer Messenger RNS mit (+)-Strang entspricht dem unspezifischen Radioaktivitätsuntergrund an Leerfiltern, der auch durch RNase-Verdau nicht zu eliminieren ist. Ähnliche Werte (376, 398 cpm) wurden mit derselben RNS-Konzentration an (+)-Strang Filtern mit 1.6 µg DNS nach 4 Stunden Hybridisationszeit erzielt, d.h. einer Zeit, bei der die hybridisierbare Radioaktivität an 0.7 µg RF II pro Filter 23 781 bzw. 24 658 cpm betrug.

Bei einer RNS-Menge von 248 µg mit der spezifischen Radioaktivität von 1.4×10^4 cpm/µg beträgt die Hybridisation an 0.7 µg denaturierter RF II 0.9%, an 1.6 µg (+)-Strang, also mehr als dem Doppelten an DNS, 5×10^{-3}% der angebotenen RNS. Setzt man die Hybridisation mit RF II gleich 100, dann liegt die Hybridisation mit (+)-Strang unter gleichzeitiger Berücksichtigung der beginnenden DNS-Sättigung für die Hybridisation an RF II unter 0.6%.

1.5 Hybridisation von RNS aus uninfizierten Zellen mit denaturierter M13 RF II

Zur Kontrolle, ob in uninfizierten Zellen RNS-Sequenzen existieren, die zu einem der Stränge der M13 RF komplementär sind und deshalb zur Hybridisation beitragen, und welchen

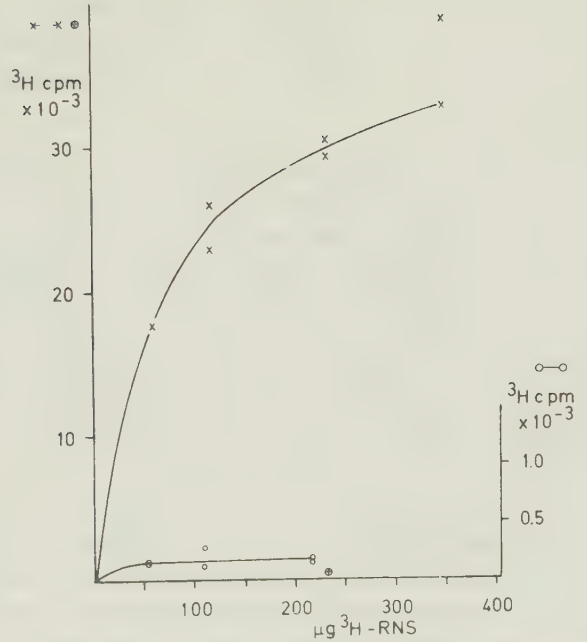

Abb. 4: DNS-Sättigungskurven für RNS aus M13 infizierten Zellen mit denaturierter M13 RF II und (+)-Strang bzw. für RNS aus uninfizierten Zellen mit denaturierter M13 RF II. RNS aus infizierten Zellen (von 30-40 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil markiert; Aufarbeitung siehe C 12.1.1 u. 13) wurde in den angegebenen Mengen mit 0.7 µg denaturierter RF II/Filter (x-x), 1.6 µg (+)-Strang DNS/Filter (+) und Leerfiltern (o) inkubiert. RNS aus uninfizierten Zellen, die parallel zur infizierten Kultur ebenfalls 10 min mit ^{3}H-Uracil markiert worden waren (Aufarbeitung siehe C 12.1.2 u. 13) wurde in den angegebenen Mengen mit 0.7 µg RF II/Filter hybridisiert (o-o).
Die Hybridisationen wurden in 2 ml 2xSSC bei 66°C über 10 Stunden durchgeführt. Die spezifische Radioaktivität der RNS aus infizierten Zellen betrug 1.4×10^4 cpm/µg, die der RNS aus uninfizierten Zellen 3.95×10^3 cpm/µg.

Einfluß nicht vollständig vom Filter eliminierbare stabile (ribosomale) RNS auf die Genauigkeit des Hybridisationstests ausüben, wurde mit RNS aus uninfizierten Zellen eine DNS-Sättigungskurve mit denaturierter RF II ermittelt (siehe Abb. 4; D 1.4).

Bereits bei einer RNS-Menge von weniger als 54 µg wird das DNS-Sättigungsplateau erreicht. Das frühe Eintreten der DNS-Sättigung ohne weiteren meßbaren Anstieg bedeutet, daß die gefundene Hybridisation zum überwiegenden Teil unspezifisch ist. Aus der RNS-Menge von 54 µg, bei der die Sättigungskurve in das Plateau einmündet, errechnet sich mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität der verwendeten RNS von 3.9×10^3 cpm/µg eine Hybridisation von angenähert 6×10^{-2}%, bezogen auf die angebotene Radioaktivität.

Daß in uninfizierten Coli-Zellen RNS-Sequenzen existieren, die mit phagenspezifischer DNS hybridisieren, ist wiederholt berichtet worden. Z.B. fanden Hayashi, Hayashi und Spiegelman (1963a) in uninfizierten Coli-Zellen RNS, die komplementär zu einem Teil des (+)-Stranges von ØX 174 ist, aber nur bis fünf Minuten nach Infektion nachzuweisen ist.

Die hier gefundene Hybridisation von RNS aus uninfizierten Zellen mit M13 RF liegt mit 150 cpm um den Faktor drei über der unspezifisch an Leerfiltern mitgeschleppten Radioaktivität (45 cpm bei derselben RNS-Konzentration). Diese Hybridisation ist im Vergleich zur spezifischen vernachlässigbar klein. Das Material, das für die unspezifische Hybridisation verantwortlich ist, ist außerdem so klein, daß es bei der später beschriebenen Molekulargewichtsbestimmung in dreiprozentigen Polyacrylamidgelen (D 2.2.3 u. 2.2.4) bei der dort verwendeten Auftrennungszeit aus dem Gel herauswandert, wie die fehlende Hybridisation der aus uninfizierten Zellen gewonnenen ^{32}P-RNS zeigte.

Wie die angeführten Experimente zeigen, hybridisiert die M13 spezifische Messenger RNS zumindest zu 99.4% (D 1.4) mit dem (-)-Strang der M13 RF, wenn man den mit RF gefundenen Hybridisationswert gleich 100% setzt, während die mit (+)-Strang DNS gemessene Hybridisation im Vergleich dazu nur 0.6% beträgt. Dieser Wert entspricht dem an Leerfiltern gefundenen unspezifischen Radioaktivitätsuntergrund und ist wahrscheinlich unspezifisch, wie die folgende Argumentation zeigt: Unter der Annahme, daß die Transkription aller M13 Gene annähernd gleich häufig abläuft, repräsentiert der für den (+)-Strang gefundene Hybridisationswert 0.6% des (+)-Stranges, der ein Molekulargewicht von $2x10^6$ hat (Ray, Preuss u. Hofschneider, 1966). Bei einem mittleren Molekulargewicht von 300 pro Nukleotid entsprechen 0.6% des (+)-Strangs nur vierzig Nukleotiden und damit einem Informationsgehalt von ungefähr 13 Aminosäuren. Selbst unter der Annahme, daß die DNS-Sequenzen, mit denen der (+)-Strang der M13 RF 0.6% der M13 spezifischen Messenger RNS bindet, auf dem (+)-Strang hintereinander liegen, entspräche dieser Wert einem derart kleinen Peptid, daß ihm wahrscheinlich keine Bedeutung für die phagenspezifische Replikation zugeordnet werden kann. Die andere Denkmöglichkeit, nämlich daß der Hybridisationswert von 0.6% eine Messenger RNS repräsentiert, die komplementär zum (+)-Strang ist, jedoch mit geringerer Häufigkeit synthetisiert wird als die anderen, läßt sich dagegen nicht von vornherein ausschließen. Z.B. entspricht eine Messenger RNS, die das kleinste bekannte M13 spezifische Protein mit 49 Aminosäuren (Beyreuther 1968) kodieren könnte, mit 147 Nukleotiden ungefähr 2-3% des Informationsgehaltes des (+)-Stranges. Mit einer um den Faktor 4 niedrigeren Syntheserate einer ähnlich großen Messenger RNS würde ein dem oben angeführten Hybridisationswert entsprechendes Ergebnis gefunden. Jedoch gingen diese Überlegungen davon aus, daß es sich bei der gefundenen Hybridisation ausschließlich um

eine spezifische Hybridisation handelt und die hybridisierende RNS einem sehr kleinen Protein entspricht. Da jedoch der überwiegende Teil der am (+)-Strang gefundenen Hybridisation wahrscheinlich durch nicht vollständig eliminierbare stabile RNS hervorgerufen wird, kann geschlossen werden, daß die M13 Messenger RNS ausschließlich zum (-)-Strang komplementär und damit zum (+)-Strang homolog ist.

Dieser Befund wird durch Schlußfolgerungen aus Beobachtungen anderer Autoren über das Suppressionsverhalten von amber-Mutanten bei fd-artigen Phagen gestützt. Dazu sollen die beiden folgenden Experimente angeführt werden: Werden durch Hydroxylaminmutagenese von fd-artigen Phagen amber (UAG)-Mutanten erzeugt, so sind für einige von ihnen su1- und su2-Wirte permissiv, su3-Wirte dagegen nichtpermissiv. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist folgende (Marvin u. Hohn, 1969; S. 180): Durch Hydroxylamin werden bekanntermaßen nur Einstufentransitionen vom Typ C → T erzeugt (Champe u. Benzer, 1962; Tessman, Poddar u. Kumar, 1964; Tessman 1968). Das amber-Codon UAG, das auf der Messenger RNS als "nonsense"-Codon wirkt und zum Kettenabbruch der in Synthese befindlichen Polypeptidkette führt, kann auf der Phagen-DNS auf Grund der Spezifität der Mutagenese nur aus CAG entstanden sein, wenn Messenger RNS und (+)-Strang einander homolog sind bzw. aus CCA, wenn (+)-Strang und Messenger RNS einander komplementär sind. CAG kodiert für Glutamin; dem Triplet CCA im (+)-Strang entspricht UGG in einer komplementären Messenger RNS, das zum Einbau von Tryptophan in die wachsende Polypeptidkette führt. Von den drei bekannten amber-Suppressoren (Garen 1968) setzt ein su2-Wirt für das amber-Codon UAG Glutamin, ein su3-Wirt dagegen Tyrosin ein. Tyrosin sollte ein schlechtes Analogon für Glutamin, aber ein gutes für Tryptophan sein. Daß ein su3-Wirt nichtpermissiv für bestimmte hydroxylamininduzier-

te amber-Mutanten ist, bedeutet deshalb, daß in diesen Fällen das amber-Codon aus CAG entstanden sein muß und folglich (+)-Strang und Messenger RNS zumindest für das betroffene Gen einander homolog sind.

Der zweite auf die Homologie zwischen (+)-Strang und Messenger RNS deutende Befund betrifft die phänotypische Reversion von fd amber-Mutanten durch 5-Fluoruracil. Dieses Basenanalogon wird in Messenger RNS anstelle von "U" eingesetzt, aber als "C" gelesen. Bei amber-Mutanten, für die ein su3-Wirt nichtpermissiv ist und die durch 5-Fluoruracil supprimiert werden, muß das amber-Codon UAG als CAG gelesen und Glutamin an die Stelle des sonst eintretenden Kettenabbruchs gesetzt werden (Marvin u. Hohn, 1969, S. 180). In Verbindung mit den im vorhergehenden Experiment angeführten Überlegungen über die Erzeugung des amber-Codons UAG ergibt sich, daß (+)-Strang und Messenger RNS zumindest für das betroffene Gen homolog sein müssen.

Nachdem in diesem Abschnitt gezeigt wurde, daß die M13 spezifische Messenger RNS zum (+)-Strang homolog ist und vom (-)-Strang transkribiert wird, soll im weiteren untersucht werden, ob die im (-)-Strang gespeicherte Information in Form einer einzigen hochmolekularen Messenger RNS an den Ort der Proteinbiosynthese weitergegeben wird oder ob sie auf kleinere Messenger-Moleküle übertragen wird.

2 Untersuchungen über die Größenverteilung der M13 spezifischen Messenger RNS

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, kann man hoffen, aus der Größenverteilung der Messenger RNS einen Hinweis auf die Zahl der Transkriptionsinitiationsorte auf der DNS-Matrize zu erhalten. Eine Auskunft über diesen Punkt könnte die zur Zeit in anderen Laboratorien in Angriff ge-

nommene Sequenzierung der RNS-Initiationsorte komplementieren, die einen vielversprechenden Ansatz zur bisher nur wenig erfolgreichen Sequenzierung von DNS darstellen. Aus derartigen Untersuchungen kann man weiterhin eine Antwort darauf erwarten, wie die Regulation der Synthese der verschiedenen phagenspezifischen Proteine in der Zelle verlaufen könnte. Wie weiter unten ausführlicher diskutiert, sind die in infizierten Zellen gefundenen phagenspezifischen Proteine in sehr unterschiedlicher Menge vertreten. Die Hauptmenge wird von dem Gen 5-Protein, das die Synthese von Phageneinzelstrang steuert, und vom Phagenhüllprotein gestellt. Vom Gen 5-Produkt liegen 35 Minuten nach Infektion bis 10 000 Kopien pro infizierte Zelle vor (Henry u. Pratt, 1969), vom Hüllprotein (Gen 8-Produkt) werden bis zu 20 000 Kopien gefunden (Beyreuther 1968; Marvin u. Hohn, 1969).

Zwei Modelle sind denkbar, welche die hohe Syntheserate einiger weniger Proteine erklären:
1) Die Transkription des (-)-Stranges erfolgt in eine polycistronische Messenger RNS (Rich, Penman, Becker, Darnell u. Hall, 1963; Spiegelman 1963 a u. b), wobei eine polycistronische Messenger RNS so definiert sein soll, daß ihre Synthese an einem einzigen definierten Initiationsort auf der DNS-Matrize einsetzt und zu einer Messenger RNS führt, die den gesamten Informationsgehalt der komplementären DNS beherbergt. Beispiele für eine solche polycistronische Messenger RNS sind MS 2 - oder M12 RNS (Kaerner 1969; Konings, Ward, Francke u. Hofschneider, 1970) und die Messenger RNS des try-Operons (Morse, Baker u. Yanofsky, 1968), lac-Messenger RNS (Brown, Brown u. Zabin, 1967; Kepes 1967), gal-Messenger RNS (Michaelis u. Starlinger, 1967; Wilson u. Hogness, 1969) und his-Messenger RNS (Whitefield, Gutnick, Margolies, Martin, Rechler u. Voll, 1970). Die Messenger RNS müßte mehrere Ribosomenbindungsorte für die Syn-

these der verschiedenen Proteine aufweisen, die jedoch im Gegensatz zu den oben erwähnten bakteriellen Messenger RNS, bei denen die auf der RNS folgenden Cistren ungefähr gleich oft translatiert werden, mit unterschiedlicher Häufigkeit genutzt werden können. Die Syntheserate würde auf diese Weise auf dem Translationsniveau reguliert; die Transkription erfolgt in eine hochmolekulare Messenger RNS, die in ihrem Molekulargewicht angenähert dem der komplementären DNS, des (-)-Strangs der M13 RF, entspricht.

2) Die Regulation der Syntheserate der einzelnen Proteine erfolgt bereits auf dem Transkriptionsniveau. Die Proteine, die besonders rasch synthetisiert werden müssen, werden von individuellen kleineren Messenger RNS kodiert, die entweder nur die Information für ein Protein (monocistronische Messenger) oder einige wenige enthalten (oligocistronische Messenger). Die Syntheserate der entsprechenden Produkte wird entweder dadurch bestimmt, daß die Messenger RNS häufiger als andere synthetisiert wird oder - bei gleicher Syntheserate im Vergleich zu den anderen Messengern - dadurch, daß an ihr besonders häufig der Synthesestart einer Polypeptidkette erfolgen kann.

Die Modelle 1 und 2 sollten sich an Hand der Größe der aufgefundenen Messenger RNS unterscheiden lassen. Die Bestimmung der Größe erfolgt in den weiter unten aufgeführten Experimenten durch Bandsedimentation in Saccharosedichtegradienten und durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen.

Hinweise auf die zu erwartende Größenverteilung liefern die folgenden Befunde: Bei Untersuchungen über das Komplementationsverhalten von M13 amber-Mutanten (Pratt, Tzagoloff, Erdahl u. Henry, 1967) wurde gefunden, daß die Gene 1, 3 und 6 (siehe auch Marvin u. Hohn, 1969) einander nur schwach komplementieren und ein polarer Effekt in Richtung 3-6-1 auftritt. Er könnte darauf hinweisen, daß diese drei

Gene auf einer zumindest oligocistronischen Messenger RNS übertragen werden. Ein polarer Effekt, der in derselben Weise interpretiert wurde (Tessman, Kumar u. Tessman, 1967), findet sich bei den Genen IIIa und IIIb des mit ØX 174 eng verwandten Phagen S13.

Die Charakterisierung der in vivo gefundenen Messenger RNS von ØX 174 durch vergleichende Säulenchromatographie von Nukleinsäuren aus infizierten und uninfizierten Zellen weist auf einen polycistronischen Messenger hin (Hayashi, Hayashi u. Spiegelman, 1963a). Sinsheimer (1968, S. 158) beschreibt für die in-vivo ØX Messenger RNS, die durch einen 45 Sekunden Puls 8 Minuten nach Infektion markiert und anschließend durch Chromatographie über benzoylierte, naphthoylierte DEAE-Zellulose gereinigt wurde (Sedat, Kelly u. Sinsheimer, 1967), ein heterogenes Profil bei Saccharosegradientenzentrifugation, das mehrere Gipfel im Bereich der 23s und 16s ribosomalen RNS aufweist und sich teilweise noch in das höhermolekulare Gebiet erstreckt.

Eine ähnliche Verteilung wurde für die in vitro an ØX RF I synthetisierten RNS gefunden (Hayashi 1965). Die RNS mit dem höchsten Molekulargewicht nach vierzig Minuten Synthesezeit wanderte mit einem Sedimentationskoeffizienten von 28s, der angenähert dem Molekulargewicht 1.6-1.7x10^6 entsprach. Sie wurde deshalb als polycistronischer Messenger aufgefaßt, der ungefähr dem vollen Umfang des (-)-Stranges bei ØX RF entspricht. Daneben wurden weitere RNS Spezies mit 23, 19, 15 und 10s entdeckt.

Die Aufarbeitung der M13 Messenger RNS durch Vorreinigung über eine Zellulosesäule (Franklin 1966) erfolgte in der Erwartung, daß sie in ihrem Molekulargewicht in etwa der ØX Messenger RNS entsprechen könnte. In der 15% Äthanolfraktion wird M12 RNS, die als Modellfall für eine poly-

cistronische Messenger RNS angesehen werden kann, von der Säule eluiert. Die Auswahl dieser Fraktion für die weiteren Untersuchungen über die M13 Messenger RNS stellte somit eine Vorselektion auf eine bestimmte Größe der M13 Messenger RNS dar. In der 15% Äthanolfraktion wurde die M13 Messenger RNS auch gefunden. Jedoch sollte hier erwähnt werden, daß damit bewußt zunächst auf eventuell vorhandene kleinere M13 Messenger RNS verzichtet wurde. Von ihnen war zu erwarten, daß sie in der 35% Äthanolfraktion, bei der Transfer-RNS und Bruchstücke von M12 RNS eluiert werden, von der Säule gewaschen werden. Da in dieser Fraktion aber auch sämtliche doppelsträngige DNS aus den infizierten Zellen auftritt, war eine Untersuchung dieser Fraktion auf M13 Messenger RNS durch Hybridisation nicht ohne weiteres möglich. Eine genaue Bilanz der intrazellulär auftretenden M13 Messenger RNS wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese möglich und ist unter D 2.2.3 beschrieben.

2.1 Bandsedimentation in Saccharosedichtegradienten

Für eine vorläufige Molekulargewichtsbestimmung der M13 Messenger RNS erschien die Sedimentation der RNS aus infizierten Zellen in Saccharosedichtegradienten nach Entfernung der DNS durch Zellulosesäulenchromatographie (C 13) geeignet. Die M13 spezifische Messenger RNS wird nach Fraktionieren des Gradienten durch Hybridisation jeder einzelnen Fraktion mit denaturierter M13 RF II nachgewiesen (vergl. Kourilsky, Marcaud, Sheldrick, Luzzati u. Gros, 1968).

Um den Nachweis der M13 Messenger RNS nach der durch den Gradienten bedingten Verdünnung zu erleichtern, wurde die spezifische Radioaktivität der M13 Messenger RNS erhöht. Zu diesem Zweck wurde ein 1 Minuten Puls mit ^{3}H-Uracil 30 Minuten nach Infektion durchgeführt. Eine uninfizierte Kultur wurde parallel dazu bei der gleichen Zelldichte

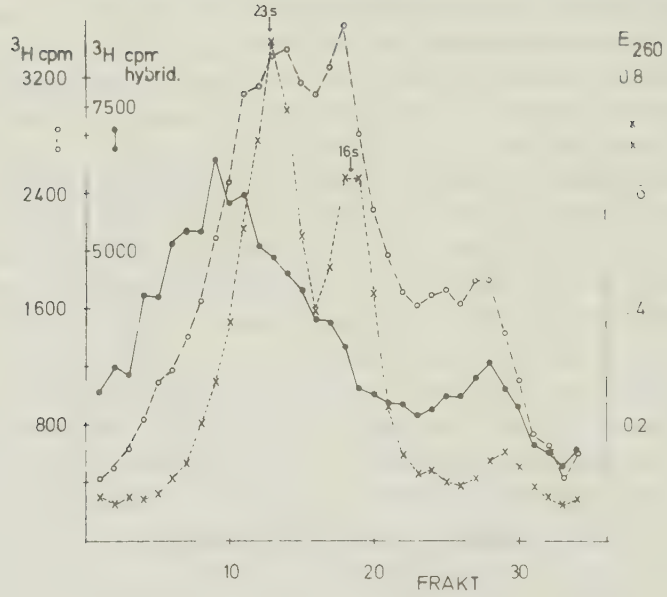

Abb. 5: Bandsedimentation von RNS aus M13 infizierten Zellen in einem Saccharosedichtegradienten. 830 µg RNS aus M13 infizierten Zellen, die von 30-31 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren (Aufarbeitung siehe C 12.2.1 u. 13), wurden auf einen linearen Saccharosedichtegradienten (5-20%) geschichtet und 16.5 Std. bei 24 000 upm und +4°C in einem SW 25/1-Rotor (Beckman) zentrifugiert (C 14). Nach Fraktionieren des Gradienten wurden die Fraktionen auf ihre Extinktion und TCA-fällbare Radioaktivität gemessen. Ein Aliquot jeder Fraktion (C 14) wurde außerdem 19 Stunden mit 0.6 µg denaturierter M13 RF II/Filter hybridisiert. Spezifische Radioaktivität der RNS: 4.1×10^3 cpm/µg.
o-o: TCA-fällbare Radioaktivität in cpm ^{3}H/0.05 ml
x-x: E^{1cm}_{260}
●-●: hybridisierte Radioaktivität in cpm ^{3}H/ml

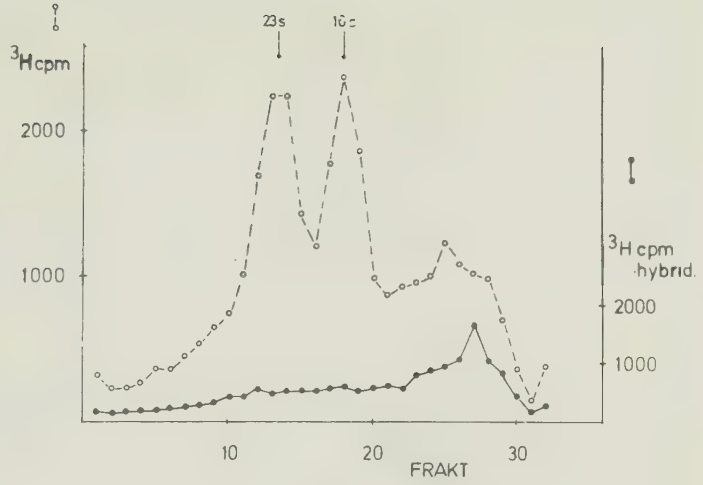

Abb. 6: Bandsedimentation von RNS aus uninfizierten Zellen in einem Saccharosedichtegradienten. 220 µg RNS aus uninfizierten Zellen, die parallel zu der Kultur in Abb. 5 1 min mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren, wurden wie in Abb. 5 beschrieben zentrifugiert und auf ihre TCA-fällbare bzw. hybridisierbare Radioaktivität ausgetestet (vergl. C 14). Symbole wie in Abb. 5. Spezifische Radioaktivität der RNS: 1.8×10^4 cpm/µg.

ebenso markiert (C 12.2.1). Nach Abtrennen der DNS wurden Aliquots der RNS-Präparationen auf Saccharosedichtegradienten aufgetrennt (C 14) und nach Fraktionieren die Radioaktivität jeder einzelnen Fraktion bestimmt (Abb. 5 u. 6; C 6.1), außerdem wurde bei den Proben aus infizierten Zellen das Extinktionsprofil bei 260 mµ aufgenommen (C 14), um die Positionen der 23s und 16s ribosomalen RNS als Molekulargewichtsstandard eindeutig festzulegen. Die Fraktionen wurden 19 Stunden mit je 0.7 µg denaturierter M13 RF II pro Filter hybridisiert.

Das Sedimentationsprofil der RNS aus infizierten Zellen zeigt ein Hybridisationsmaximum um 27s, außerdem ein Nebenmaximum nahe dem Meniskus des Gradienten. Bei der Probe aus uninfizierten Zellen findet sich kein Maximum im Gebiet um 27-28s, aber ebenfalls ein kleiner reproduzierbarer Gipfel hybridisierter Radioaktivität nahe dem Gradientenmeniskus. Auf Grund des kürzeren Pulses, bei dem weniger die stabile RNS, dafür aber umso mehr die Messenger RNS markiert wurde, beträgt die hybridisierbare Radioaktivität bei der RNS aus infizierten Zellen 9.4% der aufgegebenen Radioaktivität, bei der RNS aus uninfizierten Zellen 2.9%. Diese Werte haben jedoch nur relativen Charakter, da keine zeitlichen Sättigungskurven angelegt wurden und deswegen nicht gesagt werden kann, ob die einzelnen Fraktionen des Gradienten mit der RNS aus infizierten Zellen erschöpfend hybridisiert wurden.

Eine Hybridisation der RNS aus uninfizierten Zellen wurde bereits in Abschnitt D 1.5 diskutiert. Da bei der RNS aus infizierten Zellen das Nebenmaximum der hybridisierbaren Radioaktivität an derselben Position wie das Maximum der uninfizierten Kontrolle erscheint, kann es ebenfalls die Folge einer unspezifischen Hybridisation sein. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß teilweise degradierte M13 Messenger RNS oder in vivo vorkommende kleinere M13 Messenger Spezies ebenfalls in diesem Gebiet banden und spezifisch hybridisieren. Auf jeden Fall hat der überwiegende Teil der M13 Messenger RNS entsprechend seiner durch Extrapolation von den 23s und 16s ribosomalen RNS ermittelten Sedimentationskonstanten von 27-28s ein angenähertes Molekulargewicht von $1.5\text{-}2\text{x}10^6$.

2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Bestimmung des Molekulargewichts der M13 Messenger RNS im Saccharosedichtegradienten erlaubt zwar eine Aussage

darüber, ob die M13 Messenger RNS monocistronisch ist oder von einem größeren Teil des (-)-Stranges transkribiert wird, jedoch läßt sich wegen der ihr anhaftenden Ungenauigkeit nicht schließen, ob sie die ganze Information der DNS-Matrize enthält. Es könnte z.B. der Fall sein, daß sie ein Molekulargewicht von nur 1.5×10^6 besitzt und zusammen mit einer weiteren kleineren RNS transkribiert wird, die im Gebiet der 16s ribosomalen RNS bandet und wegen der breiten Bandenstruktur im Saccharosedichtegradienten nicht entdeckt wird.

Eine genauere Molekulargewichtsbestimmung, als sie durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation möglich ist, erlaubt die elektrophoretische Auftrennung von RNS in Polyacrylamidgelen (Loening 1967), bei der ein direkter proportionaler Zusammenhang zwischen der im Vergleich zu zwei Markierungssubstanzen im elektrischen Feld gewanderten Entfernung und dem Logarithmus des Molekulargewichts besteht (Loening 1969).

Abb. 7 zeigt die Verteilung der Gesamt-RNS und der hybridisierbaren RNS nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2.4% Polyacrylamidgel (C 15). Das Hybridisationsprofil zeigt eine breite Verteilung mit einem Maximum entsprechend einem Molekulargewicht von 1.9×10^6. Dieser Befund ist mit einem polycistronischen Messenger vereinbar, der dem kodierenden (-)-Strang in seiner Größe entspricht (Molekulargewicht 2×10^6; Ray, Preuss u. Hofschneider, 1966).

Nicht berücksichtigt wurde bisher die Möglichkeit, daß ausser der polycistronischen Messenger RNS kleinere M13 spezifische Messenger RNS synthetisiert werden, die bei der Aufarbeitung z.B. in der 35% Äthanolfraktion der Zellulosesäulenchromatographie verloren gehen.

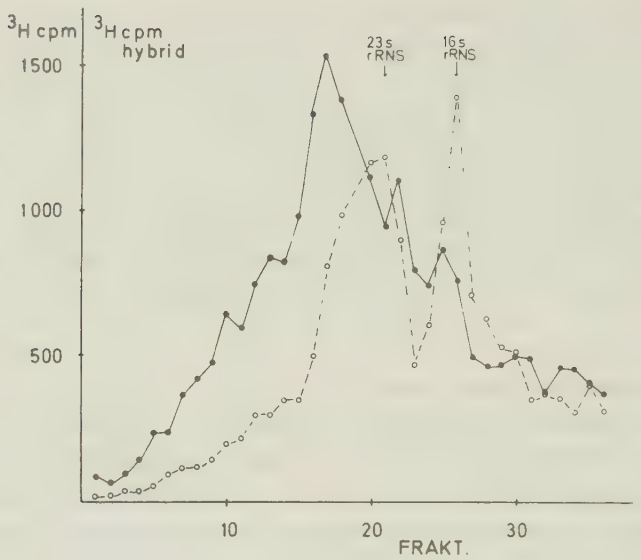

Abb. 7: Gelelektrophoretische Auftrennung von RNS aus M13 infizierten Zellen. 80 µg RNS aus M13 infizierten Zellen, die von 30-31 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil markiert worden waren (Aufarbeitung identisch mit der in Abb. 5), wurden 75 min bei 5 mA/Gel auf einem 2.4% Polyacrylamidgel aufgetrennt (C 15). Das Gel wurde anschließend in 1 mm Scheiben geschnitten, und das Eluat der Scheiben wurde auf TCA-fällbare und hybridisierbare Radioaktivität ausgetestet (C 15). Die Hybridisation wurde 19 Std. in 2xSSC, 0.5% SDS bei 66°C mit 0.6 µg denaturierter M13 RF II/Filter durchgeführt.
o-o: TCA-fällbare Radioaktivität in cpm/0.1 ml
●-●: hybridisierte Radioaktivität pro Fraktion

Die breite Verteilung des Hybridisationsprofils ließe sich auf drei verschiedene Arten erklären:

1) Bereits in vivo liegt eine heterogene Größenverteilung der M13 Messenger RNS vor, die durch rasche Synthese und Degradation erzeugt wird. Die Polyacrylamidgelelektrophorese gibt die in-vivo Situation ohne Verfälschung wieder.

2) Die heterogene Verteilung ist ein Aufarbeitungsartefakt und wird entweder nachträglich durch unspezifische Degradation einer polycistronischen Messenger RNS der vollen Genomgröße oder durch Aggregation einer bzw. mehrerer kleiner RNS-Spezies hervorgerufen.
3) Bei ^{3}H-Uracilmarkierungen wird stets etwas Radioaktivität in die DNS eingebaut. Mitmarkierter M13 Einzelstrang (oder DNS-Einzelstrangfragmente, die eventuell als Replikationsintermediäre auftreten), wird nicht durch die Vorreinigung über Zellulosesäulen abgetrennt, sondern findet sich mit ribosomaler und Messenger RNS in der 15% Äthanolfraktion. Die einzelsträngigen DNS-Moleküle werden mit auf die Gelelektrophorese gegeben und wandern ungefähr so schnell wie M13 Messenger RNS in das Gel hinein. Bei der Hybridisation binden sie an die Filter und führen zu weiteren, schlecht abgetrennten Radioaktivitätsmaxima, die so zur Verbreiterung des Radioaktivitätsprofils nach der Hybridisation beitragen.

Diese Möglichkeiten wurden mit Hilfe der weiteren Experimente untersucht. Dabei wurde von den folgenden Überlegungen ausgegangen: Durch die Vorreinigung über eine Zellulosesäule wird die Gefahr einer nukleolytischen Degradation der RNS vor der Gelelektrophorese erhöht und könnte zum partiellen Abbau der polycistronischen Messenger RNS führen. Deshalb wurde auf die Vorreinigung über eine Zellulosesäule verzichtet. Als zusätzliche Vorsichtsmaßnahme wurde die RNS nur noch unter Detergensschutz (auch vor der Gelelektrophorese) gehandhabt (0.2% SDS), um eine eventuell in der Probe vorhandene RNase-Aktivität zu inhibieren.

Außer durch eine möglicherweise eingetretene nukleolytische Degradation konnte die Vorreinigung über eine Zellulosesäule durch die zur Chromatographie notwendige Salzkonzentration (0.1m Natriumchlorid, 0.05m Tris) die Genauigkeit der Molekulargewichtsbestimmung beeinträchtigen. Asano (1965)

und Hayes, Hayes und Guérin (1966) fanden, daß speziell unter hohen Salzkonzentrationen wie >0.5 molar an einwertigen und 0.01 molar an divalenten Ionen Messenger RNS mit ribosomaler RNS zu Aggregaten komplexiert. Da nicht auszuschließen ist, daß M13 Messenger RNS bereits bei niedrigeren Salzkonzentrationen zur Aggregation neigt, wurde die RNS nur noch bei niedriger Salzkonzentration (0.01m Tris, 0.001m EDTA) gehandhabt. Die Untersuchung der Nukleinsäurepräparationen aus infizierten Zellen auf M13 spezifische Messenger RNS erfolgte ohne weitere Vorreinigung direkt auf dreiprozentigen Polyacrylamidgelen (C 15). Das dreiprozentige Gel wurde gewählt, um den im Gel erfaßbaren Molekulargewichtsbereich so zu erweitern, daß neben der im Saccharosegradienten und im 2.4 prozentigen Gel bereits gezeigten hochmolekularen RNS auch noch kleinere bis hinunter zur Größe der Transfer-RNS erfaßt werden können. Auf diese Weise konnte eine Bilanz sämtlicher intrazellulär auftretender M13 Messenger RNS-Spezies aufgestellt werden.

2.2.1 Ausschluß einzelsträngiger Phagen-DNS von dreiprozentigen Polyacrylamidgelen

In Abschnitt D 2.2 wurde die Möglichkeit erwähnt, daß die intrazelluläre phagenspezifische Einzelstrang-DNS bei der Pulsmarkierung teilweise mitmarkiert werden könnte und, da sie mit auf die Gelelektrophorese gegeben wird, möglicherweise nach der Elution der Nukleinsäuren beim Hybridisationstest durch Binden an die Filter zu einer unspezifischen Verbreiterung des Radioaktivitätsprofils führt. Für diese Störung wäre die während des Pulses mitmarkierte phagenspezifische einzelsträngige DNS verantwortlich. Doch auch die bereits vor dem Puls synthetisierte und in den Zellen angehäufte, jedoch nicht radioaktiv markierte (+)-Strang DNS könnte dadurch eine Verfälschung der Molekulargewichtsbestimmung der M13 spezifischen Messenger RNS

verursachen, daß sie durch die Renaturierung mit dem (-)-Strang der denaturierten M13 RF II, die an die Filter gebunden für die Hybridisation angeboten wird, die für die Bindung der Messenger RNS erforderliche Matrize "wegtitriert". Aus diesen beiden Gründen erschien es notwendig zu bestimmen, wie weit intakter M13 (+)-Strang bei maximaler Auftrennungszeit in ein dreiprozentiges Polyacrylamidgel wandert.

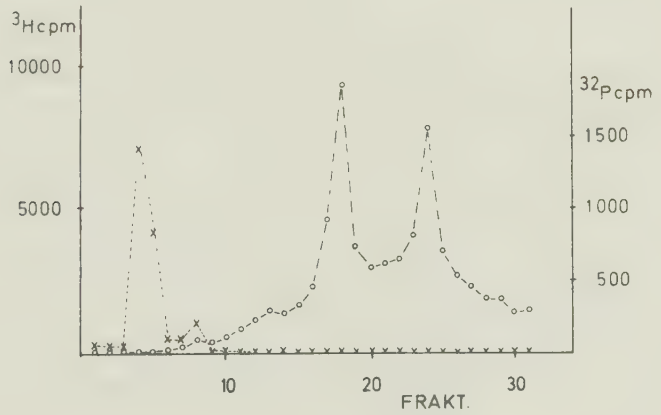

Abb. 8: Gelelektrophoretische Auftrennung von M13 Einzelstrang DNS und ribosomaler RNS. Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen, die von 30-31 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren, wurden mit ^{32}P-M13-(+)-Strang DNS (C 8.1) gemischt und 4.5 Std. bei 5 mA/Gel auf einem dreiprozentigen Polyacrylamidgel (C 15) aufgetrennt. Nach dem Schneiden des Gels wurden die 2 mm-Scheiben in Piperidin-Hyaminhydroxid aufgelöst und in Kinard's Reagens auf ihre Radioaktivität gemessen (C 6.4)
o-o: ^{3}H in cpm/Fraktion
x-x: ^{32}P in cpm/Fraktion

Für diese Fragestellung wurde eine Nukleinsäurepräparation, die eine Minute von 30 bis 31 Minuten nach Infektion mit

^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden war (entsprechend C 12.2.1) mit ^{32}P-markiertem (+)-Strang (C 8.1) gemischt und 4.5 Stunden auf einem dreiprozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Radioaktivität der einzelnen Gelscheiben wurde nach Schneiden und Auflösen bestimmt (Abb. 8).

Selbst nach einer Wanderungszeit, bei der die 16s ribosomale RNS schon 75% des Gels durchlaufen hat, ist der M13 (+)-Strang nur in den ersten Fraktionen (≙ 12% der Gesamtlänge des Gels) nachweisbar. Da bei allen weiteren Untersuchungen über die elektrophoretische Beweglichkeit der M13 spezifischen Messenger RNS Auftrennungszeiten von 2 bis 2.5 Stunden gewählt wurden, ist mit intakter M13 Einzelstrang DNS nur in den ersten beiden Fraktionen eines Gels zu rechnen. Der kompetitive Effekt von M13 Einzelstrang auf die Hybridisation von M13 Messenger durch Titration des angebotenen (-)-Stranges sowie die Bindung von mitmarkierter (+)-Strang DNS an die Filter, die Messenger RNS vortäuschen könnte, ist damit für alle Fraktionen eines dreiprozentigen Gels außer den beiden ersten nicht zu berücksichtigen.

2.2.2 Ausschluß fragmentierter DNS von Polyacrylamidgelen

Im vorhergehenden Abschnitt wurde für intakte Einzelstrang DNS durch Koelektrophorese von ^{32}P-(+)-Strang mit ribosomaler tritiummarkierter RNS gezeigt, daß sie bei der Molekulargewichtsbestimmung der M13 Messenger RNS nicht stört. Da jedoch nicht a priori auszuschließen ist, daß in infizierten Zellen (+)-Strangfragmente als Replikationsintermediäre auftreten oder kleinere Bruchstücke von Coli-DNS bzw. M13 RF entstehen, die bei einem ^{3}H-Uracilpuls mitmarkiert werden, bei Verzicht auf eine Vorreinigung über eine Zellulosesäule mit auf die Gelelektrophorese aufgegeben werden und in das Gel hineinwandern könnten, wurde das folgende Kontrollexperiment durchgeführt:

Nukleinsäuren aus infizierten Zellen, die von 30-35 Minuten nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren (C 12.2.2), wurden zwei Stunden auf einem dreiprozentigen Gel aufgetrennt. Nach dem Schneiden des Gels wurden die einzelnen Scheiben des Gels mit Puffer eluiert (C 15) und ein Teil des Eluats einer Alkalihydrolyse (C 17) unterworfen. Außerdem wurden Aliquots von jeweils vier benachbarten Fraktionen vereinigt und zwanzig Stunden mit jeweils 4 µg denaturierter RF II hybridisiert (Abb. 9).

Mit der Alkalihydrolyse kann zwischen DNS und RNS differenziert werden (vergl. z.B. Schwartz, Craig u. Kennell, 1970). Dabei wird die tritiummarkierte RNS in 0.25 molarer Kalilauge bei 45°C innerhalb einer Stunde praktisch vollständig TCA-löslich, während tritiummarkierte DNS zumindest zu 85% TCA-fällbar bleibt. Die Radioaktivität, die durch Mitmarkierung von DNS durch ^{3}H-Uracil in DNS-Bruchstücken im Gel erscheint und durch Binden an die Hybridisationsfilter als M13 Messenger RNS angesehen würde, sollte durch Vergleich zwischen Alkaliresistenz und hybridartig gebundener Radioaktivität von der M13 Messenger spezifischen Radioaktivität zu differenzieren sein.

Wie Abb. 9 zeigt, findet sich eine signifikante Alkaliresistenz nur in den ersten vier Fraktionen, die mit einer hybridisierbaren Radioaktivität von fünf Prozent - gemittelt über diese Fraktionen - einhergeht. In allen anderen Fraktionen liegt die Menge alkaliresistenten Materials unter einem Prozent der Gesamtradioaktivität. Gemittelt über das ganze Gel erreicht sie lediglich angenähert 0.3%, während die hybridisierbare Radioaktivität 3.4% bezogen auf die Gesamtradioaktivität beträgt.

Der hohe Hybridisationswert von fünf Prozent in den ersten vier Fraktionen wurde in späteren Aufarbeitungen nicht mehr gefunden. Er hängt offensichtlich von den Scherkräften ab,

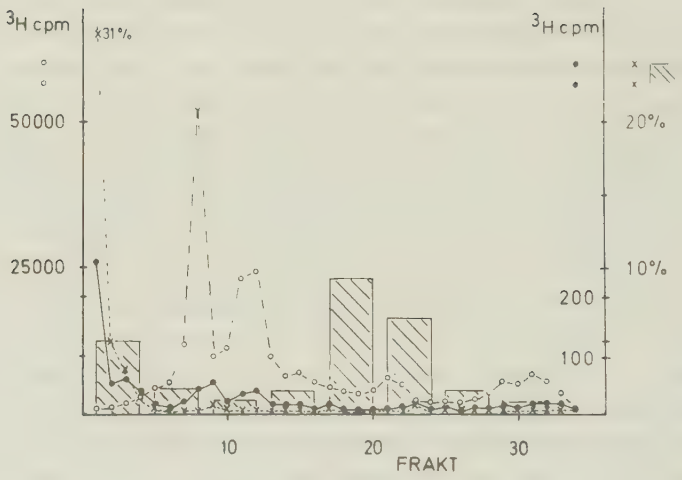

Abb. 9: Alkaliresistenz von ^{3}H-Uracil markierten Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen. Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen, die von 30-35 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil markiert worden waren (C 12.2.2), wurden 2 Std. bei 5 mA/Gel auf einem dreiprozentigen Polyacrylamidgel (C 15) aufgetrennt. Nach dem Schneiden des Gels wurden die 2 mm-Scheiben mit 2xSSC, 0.5% SDS-Lösung eluiert. Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden mit 0.25 molarer Kalilauge inkubiert (C 17) und auf ihre TCA-Fällbarkeit vor und nach der Alkalibehandlung untersucht. Ferner wurden 0.4 ml Aliquots von jeweils vier benachbarten Fraktionen vereinigt und 20 Std. mit 4 µg denaturierter M13 RF II/Filter bei 66°C hybridisiert.

o-o: TCA-fällbare Radioaktivität vor Alkalihydrolyse in cpm ^{3}H/0.75 ml

●-●: TCA-fällbare Radioaktivität nach Alkalihydrolyse in cpm ^{3}H/0.75 ml

x-x: Prozentsatz der Alkaliresistenz bezogen auf die Gesamtradioaktivität

▨: Prozentsatz der hybridisierbaren Radioaktivität

welche durch Pipettieren und Schütteln der Nukleinsäuren während der Aufarbeitung auftreten und das Molekulargewicht der DNS reduzieren. Jedenfalls steigt bei entsprechend vorsichtiger Handhabung die hybridisierbare Radioaktivität in den ersten vier Fraktionen nicht über den unspezifischen Radioaktivitätsuntergrund an.

Aus diesem und dem vorhergehenden Experiment kann geschlossen werden, daß - bei entsprechender Aufarbeitung - in der Gelelektrophorese bei anschließender Hybridisation lediglich M13 spezifische Messenger RNS erfaßt wird und keines der beobachteten Maxima auf DNS-DNS Hybridisation oder unspezifische Bindung von DNS zurückzuführen ist.

2.2.3 Molekulargewichtsbestimmung der M13 Messenger RNS Komponenten durch Gelelektrophorese

Abb. 9 zeigt weiterhin, daß außer der hybridisierbaren Radioaktivität in den Fraktionen 5-12, wo die M13 spezifische Messenger RNS nach den Experimenten in D 2.1 und D 2.2 erwartet wurde, eine erheblich höhere Hybridisation vor allem in den Fraktionen 17-24 gemessen wird. Die M13 spezifische Messenger RNS-Spezies, die in dieser Position bandet, wurde nicht bei der Untersuchung der 15% Äthanolfraktion der Zellulosesäulenchromatographie gefunden und muß in der 35% Äthanolfraktion von der Säule eluiert worden sein (C 13). Durch den Verzicht auf eine Vorreinigung über Zellulosesäulen und die unmittelbare Analyse des Nukleinsäureextraktes aus M13 infizierten Zellen wurde damit außer einer hochmolekularen Messenger RNS noch weitere mit kleinerem Molekulargewicht gefunden.

Das Auftreten weiterer kleinerer Messenger RNS neben einer hochmolekularen kann zwei Ursachen haben. Die erste Möglichkeit ist, daß große und kleine Messenger Spezies in ein und

derselben Zelle synthetisiert werden und nebeneinander gebraucht werden. Die zweite Möglichkeit besteht darin, daß z.B. früh nach Infektion die große Messenger RNS ausschließlich oder bevorzugt gebildet wird, in einem späteren Stadium dagegen nur noch die kleineren RNS-Spezies. Da auf Grund der niedrigen Adsorptionskonstanten (siehe D 1.1) die M13 Infektion in der Bakterienkultur asynchron verläuft und deshalb bei einem Puls 30-35 Minuten nach Infektion Zellen aus allen Infektionsstadien untersucht werden, ergibt sich, daß auch in diesem Fall große und kleine Messenger RNS-Spezies nebeneinander gefunden werden. Die beiden Möglichkeiten lassen sich dadurch differenzieren, daß eine M13 infizierte Kultur zu verschiedenen Zeiten nach Infektion pulsmarkiert wird. Eine Markierung von fünf bis zehn Minuten nach Infektion sollte nur die früh nach Infektion synthetisierte Messenger RNS erfassen, Radioaktivitätspulse zu späterer Zeit sollten dagegen auf Grund der Asynchronie der Infektion sämtliche bis zu dieser Zeit synthetisierten Messenger RNS-Spezies markieren.

In einem derartigen Experiment wurden einer M13 infizierten Kultur 5-10, 30-35, 60-65 und 120-125 Minuten nach Infektion jeweils fünf Minuten dauernde ^{3}H-Uracil Pulse gegeben (C 12.2.2). Um das Auftreten der M13 spezifischen Messenger RNS-Spezies mit den biologischen Parametern der Kultur vergleichen zu können, wurden in der infizierten Kultur außerdem die Zahl der infizierten Bakterien (C 5.1), der Bakterientiter (C 4) und der Phagentiter bestimmt (Abb. 10). Die Nukleinsäuren der pulsmarkierten Zellen wurden extrahiert und auf dreiprozentigen Polyacrylamidgelen analysiert (Abb. 11).

Um die in Abb. 9 (D 2.2.2) nur sehr grob charakterisierten RNS-Spezies eingehender zu beschreiben, soll zunächst nur der 30-35 min Puls (Abb. 11) betrachtet werden. Auf die Synthesekinetik der einzelnen Spezies wird in Abschnitt D 2.2.4 näher eingegangen.

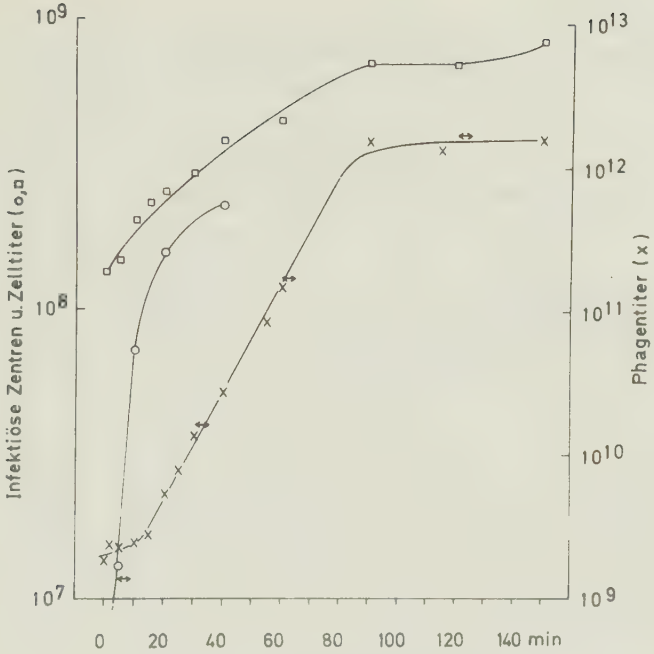

Abb. 10: Biologische Charakterisierung einer M13 infizierten Bakterienkultur. Bei dem in Abb. 11 dargestellten Experiment wurde die infizierte Kultur zu den angegebenen Zeiten auf Zelldichte, Phagentiter und nach Inaktivierung der freien und adsorbierten Phagen mit M13 Antiserum auf die Zahl der infektiösen Zentren untersucht. Die Pfeile geben den Zeitraum der ^{3}H-Uracil Pulse an.
□-□: Zelldichte (mikroskopisch bestimmt)
x-x: Phagentiter in pfu/ml
o-o: infektiöse Zentren/ml

Das Hybridisationsprofil des 30-35 min Pulses in Abb. 11 weist fünf Banden auf. Die erste wandert langsamer als die 23s ribosomale RNS (Spezies a), die zweite und dritte sind etwas langsamer bzw. schneller als die 16s ribosomale RNS (Spezies b_1 bzw. b_2) und die vierte und fünfte schneller als die 16s ribosomale aber langsamer als Transfer-RNS (Spezies c und d).

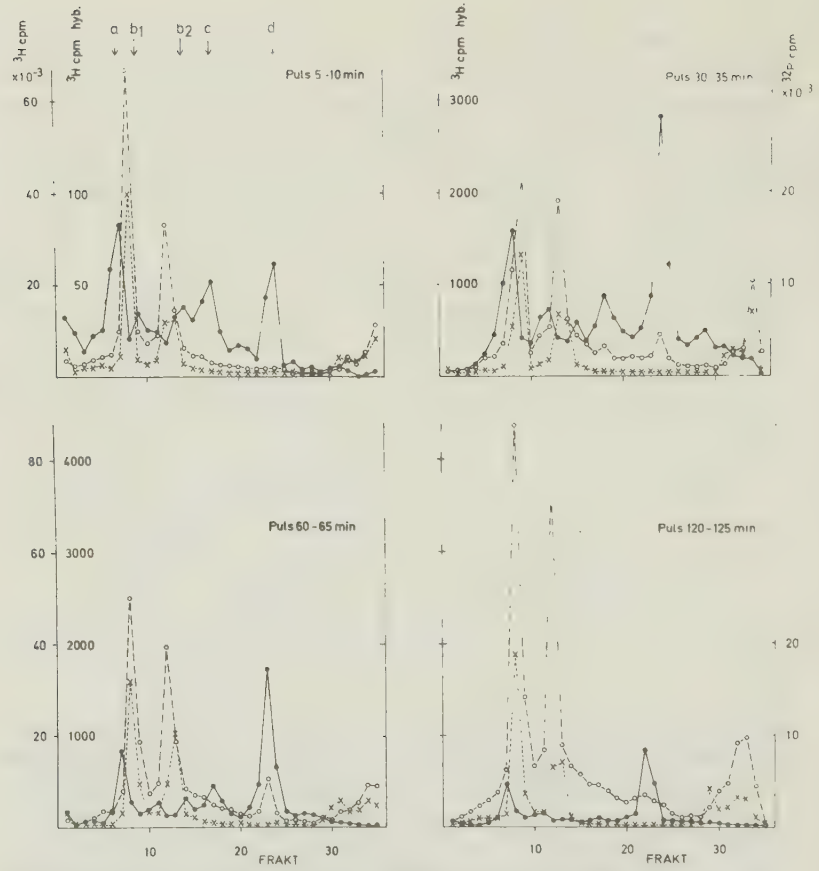

Abb. 11: Kinetik der Synthese M13 spezifischer Messenger RNS. Eine M13 infizierte Kultur wurde von 5-10, 30-35, 60-65 bzw. 120-125 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert (C 12.2.2). Zu jeder Probe wurde vor der Aufarbeitung ein Aliquot ^{32}P-markierter uninfizierter E. coli AB 301-Zellen gegeben, um die ^{3}H-Radioaktivitätswerte nach der Gelelektrophorese auf den 120-125 min Puls normalisieren zu können. Von jeder Probe wurden 25 µl 2.5 Std. bei 5 mA/Gel auf einem dreiprozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Schneiden der Gele wurden die 2 mm-Scheiben mit je 2ml 2xSSC, 0.5% SDS-Lösung eluiert, 0.08 ml auf ihre TCA-Fällbarkeit untersucht und 1.6 ml mit 4 µg denaturierter RF II/ Filter 20 Std. bei 66°C hybridisiert. Alle Radioaktivitätswerte sind in cpm/1.6 ml ausgedrückt.
o-o: TCA-fällbare ^{3}H-Radioaktivität
x-x: TCA-fällbare ^{32}P-Radioaktivität (interner Standard aus uninfizierten Zellen)
●-●: hybridisierte ^{3}H-Radioaktivität

Wenn die zurückgelegte Entfernung im Gel für die beiden ribosomalen RNS und Transfer-RNS gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte (Bishop, Claybrook u. Spiegelman, 1967; Loening 1969) aufgetragen wird, liegen sie auf einer Geraden. Durch Interpolation lassen sich aus diesem Diagramm (Abb. 12) die Molekulargewichte der M13 spezifischen Messenger RNS-Spezies ermitteln.

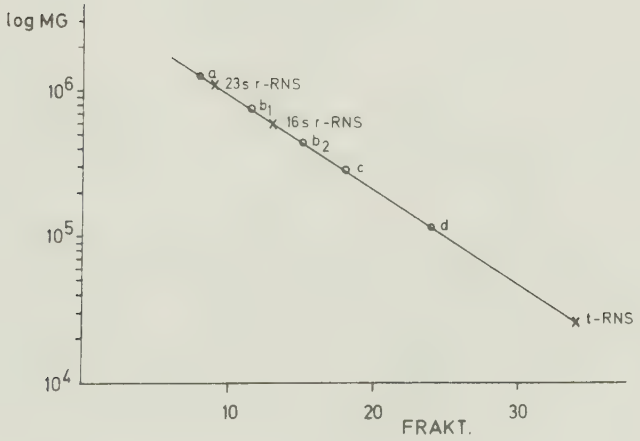

Abb. 12: Molekulargewichte der M13 Messenger RNS-Spezies. Die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten der einzelnen Spezies sind der Abb. 11 (30-35 min Puls) entnommen.

Die so gewonnenen Molekulargewichte sind in Tabelle I aufgeführt.

Tabelle I Molekulargewichte der M13 Messenger RNS-Spezies

Spezies	Molekulargewicht
a	1.3×10^6
b_1	8×10^5
b_2	5×10^5
c	3×10^5
d	1×10^5

Außer einer hochmolekularen RNS-Spezies mit einem Molekulargewicht von 1.3×10^6, das den in D 2.1 und 2.2 ermittelten Werten am nächsten kommt, wurden durch den Verzicht auf eine Vorreinigung über Zellulosesäulen und unmittelbare Analyse auf Polyacrylamidgelen vier weitere RNS-Spezies fallenden Molekulargewichts gefunden. Der Gebrauch eines sehr verdünnten Puffers (10 mM Tris, 1 mM EDTA) für die Aufarbeitung der Nukleinsäuren brachte eine erhebliche Verschärfung der Profile im Vergleich zu D 2.2 mit sich. Obwohl die Auftrennung der Nukleinsäuren im Gel, gemessen an den Positionen der beiden ribosomalen RNS-Spezies, vergleichbar mit der in Abb. 7 (D 2.2) war, wurde für die hochmolekulare M13 Messenger RNS-Spezies ein niedrigeres Molekulargewicht gefunden. Dieses Ergebnis in Verbindung mit der Verschärfung der Hybridisationsprofile läßt darauf schließen, daß die Molekulargewichtsbestimmung im Saccharosedichtegradienten und 2.4 prozentigen Polyacrylamidgel (D 2.2) durch eine Salzaggregation verfälscht war, wie sie von Asano (1965) und Hayes, Hayes und Guérin (1966) diskutiert wurde.

Da jedoch nur für dreiprozentige Polyacrylamidgele gezeigt wurde, daß Coli-DNS und M13 spezifische DNS von ihnen ausgeschlossen bleiben, kann die Möglichkeit nicht von der Hand gewiesen werden, daß bei der Molekulargewichtsbestimmung in dem 2.4 prozentigen Polyacrylamidgel (Abb. 7) eine DNS-DNS Bindung auch mit zur Verbreiterung des Hybridisationsprofils beigetragen hat.

Eine Folge des oben genannten Ergebnisses ist, daß die hochmolekulare RNS-Spezies a nicht - wie früher angenommen - die ganze phagenspezifische Information enthalten kann, sondern mit einer oder möglicherweise zwei der anderen kleineren RNS-Spezies vom (-)-Strang transkribiert werden muß. Von der im folgenden Abschnitt diskutierten Synthesekinetik der M13 Messenger RNS-Spezies kann eine Antwort darauf erhofft werden, ob die verschiedenen RNS-Spezies, welche die gesamte Information des Phagen übertragen, gleichzeitig synthetisiert werden oder ob ihre Synthese zeitlich verschieden reguliert ist.

2.2.4 Synthesekinetik der M13 spezifischen Messenger RNS-Spezies

Um an Hand der Hybridisationsergebnisse eine Aussage über die Regulation der Synthese der einzelnen M13 Messenger RNS-Spezies machen zu können, muß die Voraussetzung erfüllt sein, daß der Prozentsatz der hybridisierbaren Radioaktivität im Vergleich zur Gesamtradioaktivität im direkten funktionellen Zusammenhang mit dem Infektionszustand der Kultur steht. Die zu verschiedenen Zeiten nach Infektion gefundenen Hybridisationswerte sind in Tabelle II aufgeführt. Sie stellen den Prozentsatz der hybridisierbaren Radioaktivität im Vergleich zur im Gel gefundenen Gesamtradioaktivität dar. Die Werte wurden der Abb. 11 (D 2.2.3) entnommen.

Tabelle II Synthese der M13 Messenger RNS zu verschiedenen Zeiten nach Infektion

Puls in min nach Infektion	Hybridisierbare Radioaktivität in % der Gesamtradioaktivität	Verhältnis d/a
5 - 10	0.35	0.64
30 - 35	7.0	1.68
60 - 65	3.1	2.27
120 - 125	0.92	2.04

Diese Werte zeigen mit den über Phagentiter, Zelldichte und infektiöse Zentren gewonnenen Daten (Abb. 10) eine sinnvolle Übereinstimmung: Die Hybridisation ist zu Beginn der Infektion (5-10 min) niedrig. Zu dieser Zeit zeigt der Phagentiter noch keine Zunahme, aber die Zahl der infektiösen Zentren steigt steil an. 30-35 Minuten nach Infektion hat der Phagentiter um den Faktor zehn zugenommen, während die Kurve der infektiösen Zentren abzuflachen beginnt. Zu dieser Zeit erreicht die Hybridisation ein Maximum. 60-65 Minuten nach Infektion ist der Phagentiter hundertmal höher als zur Zeit Null, die Hybridisation nimmt ab, um bei 120-125 min unter 1% der Gesamtradioaktivität zu fallen. Zu dieser Zeit erreicht der Phagentiter einen um den Faktor tausend höheren Wert als zu Anfang und steigt nicht weiter an. Der Zelltiter erreicht ebenfalls ein Plateau. (Das spätere Ansteigen ist noch unklar, könnte aber durch ein Überwachsen der infizierten Kultur durch M13 resistente Zellen verursacht sein.) Die Hybridisationswerte spiegeln damit den Infektionszustand der Kultur getreu wider.

Die Ergebnisse des Pulsexperimentes sollen nun unter der Fragestellung betrachtet werden, ob sich das Verhältnis der einzelnen Spezies zueinander im Laufe der Infektion ändert. Das Verhältnis der kleinsten Spezies (Spezies d) zur größten (Spezies a) wurde herangezogen, um diese Frage beantworten zu können. Wie aus Tabelle II ersichtlich, ändert sich das Verhältnis d/a von 5-10 min bis 60-65 min nach Infektion um den Faktor 3.5, während bei den Spezies b_1 - c nicht so starke Verschiebungen zu registrieren sind. Allerdings lassen sich diese mittelgroßen Spezies zu späten Zeiten nach Infektion nur noch schwer nachweisen, da die Gesamthybridisation 120-125 min nach Infektion unter 1% der Gesamtradioaktivität sinkt. Trotz einer Veränderung im Verhältnis der Spezies d zu a und

einem relativ stärker ausgeprägten Verschwinden der mittleren Spezies b_1 bis c im Vergleich zu d und a werden alle M13 spezifischen Messenger RNS-Spezies früh und spät nach Infektion nebeneinander gefunden.

Das Experiment zeigt, daß Spezies a eine für den frühen Infektionszustand typische RNS-Spezies ist, Spezies d dagegen für den späten. Das Auftreten von Spezies d zu frühen Zeiten (5-10 min nach Infektion) besagt jedoch, daß zumindest zu dieser Zeit beide Spezies nebeneinander gebildet werden. Ihre Molekulargewichte ergeben zusammen einen Wert von 1.4×10^6. Das bedeutet, daß sie - selbst unter der Annahme, beide RNS-Spezies werden ohne gegenseitige Überlappung fortlaufend an der DNS-Matrize transkribiert - noch nicht einer vollen Transkriptionsrunde auf dem (-)-Strang der M13 RF entsprechen. Erst mit einer weiteren Spezies, z.B. b_2, c oder beiden zusammen, wird das Äquivalent einer vollen Transkriptionsrunde erreicht. (Dabei ist allerdings vernachlässigt, daß bestimmte Bereiche auf der DNS wahrscheinlich nicht transkribiert werden, sondern z.B. als Promotoren fungieren.) Die Summe der Molekulargewichte aller Spezies zusammen ist jedoch größer als das Molekulargewicht des (-)-Stranges. Die Konsequenz dieser Überlegung ist, daß eine oder mehrere der in Abb. 11 gefundenen RNS-Spezies relativ stabile Synthese- oder Degradationszwischenstufen anderer größerer RNS-Spezies sein könnten. Ein funktioneller Zusammenhang dieser Art soll in dem folgenden "Puls-Chase" Experiment (D 3) untersucht werden.

3 Metabolische Stabilität der M13 spezifischen Messenger RNS

Um zu untersuchen, welche der im Polyacrylamidgel gefundenen RNS-Spezies individuellen Messenger RNS-Molekülen ent-

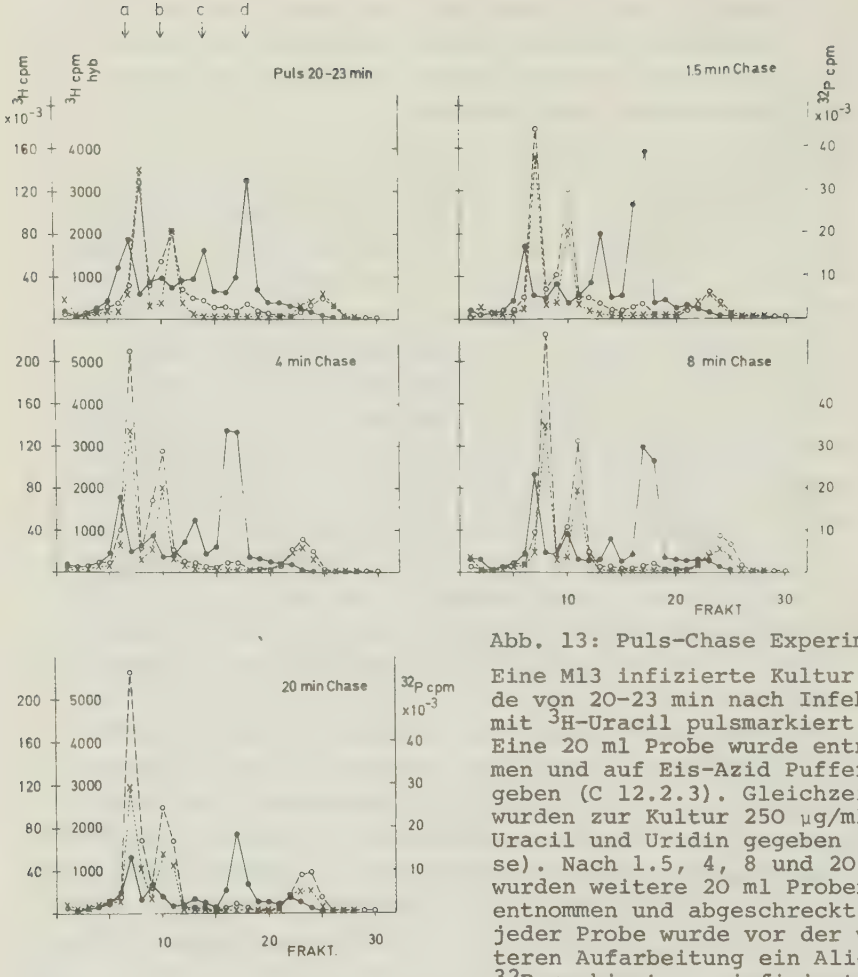

Abb. 13: Puls-Chase Experiment

Eine M13 infizierte Kultur wurde von 20-23 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert. Eine 20 ml Probe wurde entnommen und auf Eis-Azid Puffer gegeben (C 12.2.3). Gleichzeitig wurden zur Kultur 250 µg/ml Uracil und Uridin gegeben (Chase). Nach 1.5, 4, 8 und 20 min wurden weitere 20 ml Proben entnommen und abgeschreckt. Zu jeder Probe wurde vor der weiteren Aufarbeitung ein Aliquot ^{32}P-markierter uninfizierter Bakterienzellen gegeben, um die ^{3}H-Radioaktivitätswerte nach der Gelelektrophorese auf den 20 min Chase zu normalisieren. 25 µl jeder Probe wurden 2 Std. bei 5 mA/Gel auf einem dreiprozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die weiteren Schritte (TCA-Fällung und Hybridisation) sind unter Abb. 11 beschrieben.

o-o: TCA-fällbare ^{3}H-Radioaktivität
x-x: TCA-fällbare ^{32}P-Radioaktivität (interner Standard aus uninfizierten Zellen)
●-●: hybridisierte ^{3}H-Radioaktivität

Alle Radioaktivitätswerte sind in cpm/1.6 ml ausgedrückt.

sprechen und welche Synthese- oder Degradationsintermediäre darstellen, wurde ein "Puls-Chase" Experiment durchgeführt. Ein solches Experiment gestattet, den Fluß radioaktiven Materials, welches bei einem kurzen Puls in wachsende oder gerade fertig synthetisierte RNS-Moleküle eingeführt wurde, während der folgenden Nachinkubation zu verfolgen. Zwei verschiedene Antworten können von diesem Experiment erwartet werden: Zunächst sollte sich feststellen lassen, in welcher Reihenfolge die einzelnen Spezies markiert werden, d.h. welche von ihnen Synthese- oder Degradationszwischenstufen der anderen Spezies sind. Zweitens gibt das Experiment Aufschluß über die metabolische Stabilität der RNS-Spezies. Denn wenn die weitere Inkorporation radioaktiver Vorstufen in die RNS in der Nachinkubationsphase durch hohen Überschuß an nichtmarkiertem Uracil und Uridin ("Chase") unterbrochen wird, sinkt die im Gel durch Hybridisation nachweisbare Radioaktivität nach Maßgabe der Degradationsgeschwindigkeit ab. Fragmente, die kleiner als Transfer-RNS sind, wandern bereits aus dem Gel heraus und werden für die Halbwertszeitbestimmung nicht mehr erfaßt.

Abb. 13 zeigt die Hybridisationsprofile eines solchen Experiments (C 12.2.3) nach Auftrennung im Gel. (Da die Auftrennungszeit nur zwei Stunden betrug, finden sich nur vier Spezies, wobei b annähernd der Spezies b_1 entspricht.) Während das Profil der RNS unmittelbar nach dem Puls noch "verschmiert" wirkt, wird es mit fortschreitender Zeit nach dem Chase zunehmend schärfer. Dieses Phänomen läßt sich dahingehend interpretieren, daß kurz nach dem Puls die Radioaktivität vor allem in wachsenden RNS-Ketten gefunden wird, die erst zu späteren Zeiten während des Chase vervollständigt werden.

Der Prozentsatz der hybridisierbaren Radioaktivität in Bezug auf die im Gel gefundene Gesamtradioaktivität ist für den Puls 20-23 Minuten nach Infektion 3.4% und nimmt bis

zum Ende des Chase auf 1.9% ab. Die hybridisierbare Radioaktivität im Gelbereich der einzelnen Spezies ist in Tabelle III aufgeführt:

Tabelle III Abbau der M13 Messenger RNS in einem Puls-Chase Experiment

Zeit nach Infektion	Gesamthybridisation in %	% Hybridisation in Spezies a	b	c	d
3 min Puls (20-23 min)	100	100	100	100	100
1.5 min Chase (23-24.5 min)	93.5	70	95	123	116
4 min Chase (23-27 min)	93	71	106	88	118
8 min Chase (23-31 min)	82.5	81	93	44	98
20 min Chase (23-43 min)	55	67	68	28	52
3 min Puls (40-43 min)	470	494	785	540	391

Daß die hybridisierbare Radioaktivität in den kleineren Spezies 100% nach einer Chasedauer von 1.5 Minuten (d und c) und 4 Minuten (b) überschreitet, spiegelt wahrscheinlich die späte Inkorporation markierter RNS-Vorstufen in RNS-Fragmente wider, die Vorläufer für die größeren Spezies sind und während der Chaseperiode vervollständigt werden (Spezies a nach 8 Minuten Chase). Dieser Effekt könnte jedoch durch das Auftreten von Degradationsprodukten in der Position der Spezies d nach 4 bzw. 8 Minuten Chase überdeckt werden. Insgesamt läßt sich aber keine eindeutige Aussage über die Funktion einer bestimmten Spezies als Vorläufer für die anderen machen.

Auch eine Halbwertszeitbestimmung für die individuellen M13 Messenger Spezies ist mit diesem experimentellen Ergebnis nicht möglich, zumal die eindeutige Zuordnung bestimmter Gelbereiche zu den einzelnen Spezies schwierig ist.

Dieser Fehler läßt sich jedoch eliminieren, wenn man auf die Halbwertszeitbestimmung der individuellen Spezies verzichtet und nicht die hybridisierte Radioaktivität in den individuellen Spezies betrachtet wird, sondern im ganzen Gel bis einschließlich Spezies d. Auf diese Weise wird eine Bestimmung der Lebensdauer möglich, in der M13 Messenger RNS ein Molekulargewicht von mindestens $1x10^5$ hat.

Die über die Gele gemittelten Hybridisationswerte des 3 Minuten Pulses und der darauf folgenden Chaseperioden sind ebenfalls in Tabelle III aufgeführt. Die Werte sind direkt miteinander vergleichbar, da jede Probe vor der Aufarbeitung dieselbe Menge ^{32}P-markierter uninfizierter Zellen erhielt. Nach Gelelektrophorese wurde für jedes Gel die TCA-fällbare ^{32}P-Radioaktivität aufsummiert und mit Hilfe dieser Werte die TCA-fällbare und hybridisierbare ^{3}H-Radioaktivität auf den 20 Minuten Chase normalisiert. Die über das Gel gemittelten Hybridisationswerte wurden auf den 20-23 Minuten Puls bezogen, der gleich 100% gesetzt wurde.

Die Werte in Tabelle III für die Gesamthybridisation im Gel nehmen mit der Chasezeit ab. Trägt man sie im halblogarithmischen Maßstab gegen die Zeit nach Zugabe des Überschusses an kaltem Uracil und Uridin auf, läßt sich eine grobe Aussage über die Halbwertszeit der M13 Messenger RNS machen (Abb. 14). Aus dieser Auftragung ergibt sich, daß die Logarithmen der hybridisierbaren Radioaktivität eine lineare Funktion der Chasezeit sind und der Wert 50% nach einer Zeit von 24 Minuten erreicht wird.

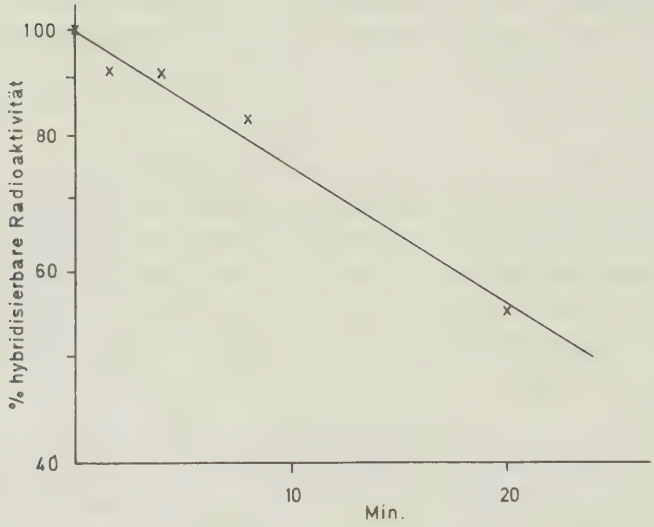

Abb. 14: Bestimmung der Halbwertszeit der M13 spezifischen Messenger RNS Spezies. Die im halblogarithmischen Maßstab gegen die Dauer des Chase aufgetragenen Hybridisationswerte sind Tabelle III entnommen.

Zu einer genaueren Bestimmung der Halbwertszeit gelangt man, wenn man die Nachinkorporation von ^{3}H-Uracil in M13 Messenger RNS während der ersten vier Minuten des Chase in Rechnung stellt. Der Wert hierfür beträgt 19% und ergibt sich aus der gesamten (TCA-fällbaren) Radioaktivität in Abb. 13. Danach findet man, bezogen auf den 3 Minuten Puls 20-23 Minuten nach Infektion, für den 1.5 Minuten Chase 103%, 119% für den 4 Minuten Chase, 109% für den 8 Minuten Chase und 118% für den 20 Minuten Chase. Für die weiteren Überlegungen wird davon ausgegangen, daß die 19% Nachinkorporation nach 4 Minuten Chase in die gesamte RNS (stabile RNS, Coli-Messenger und M13 Messenger RNS) einem 19 prozentigen Zuwachs der Radioaktivität der M13 spezifischen Messenger RNS

entspricht. Diese zusätzlichen 19% sollen mit derselben Halbwertszeit wie die Messenger RNS zerfallen, die während des 3 Minuten Pulses 20-23 Minuten nach Infektion gebildet wurde. Unter diesen Annahmen wird die Gleichung aufgestellt:

$$C_1 \cdot \exp(-\frac{\ln 2 \cdot 21.5}{t_{1/2}}) + C_2 \cdot \exp(-\frac{\ln 2 \cdot 18}{t_{1/2}}) = C_3$$

wobei C_1 die hybridisierbare Radioaktivität 23 Minuten nach Infektion ist (Beginn des Chase),

C_2 gleich 19% der hybridisierbaren Radioaktivität 27 Minuten nach Infektion ist,

C_3 die hybridisierbare Radioaktivität 43 Minuten nach Infektion ist (Ende des Chase)

und

$t_{1/2}$ die Halbwertszeit der M13 Messenger RNS,

21.5 die Zeit von der Mitte des 3 Minuten Pulses bis zum Ende der 20 minütigen Chaseperiode,

18 die Zeit von der Mitte des 4 Minuten Chase bis zum Ende des 20 Minuten Chase sind.

Aus dieser Beziehung errechnet sich eine Halbwertszeit von 18-19 Minuten für die M13 Messenger RNS entsprechend 0.6 Generationszeiten des Bakterienstammes unter den Versuchsbedingungen.

Außer der Nachinkorporation von ^{3}H-Uracil in M13 Messenger RNS muß aber noch ein anderer Effekt berücksichtigt werden, der zu einem zu niedrigen Wert für die Halbwertszeit führen könnte. Am Ende der Chaseperiode findet noch eine sehr aktive Messenger RNS-Synthese statt (Abb. 15). Wie Tabelle III zeigt, ist die hybridisierbare Radioaktivität des Pulses 40-43 Minuten nach Infektion um einen Faktor von ungefähr 5 im Vergleich zu dem Puls 20-23 Minuten nach Infektion erhöht. Das Chaseexperiment schließt diese Periode mit ein. Deshalb muß das Argument diskutiert werden, ob nicht

die Menge unmarkierter Messenger RNS, die während der Chaseperiode synthetisiert wird, so hoch ist, daß die DNS-Sättigung im Hybridisationstest (4 µg denaturierter M13 RF II/Filter) erreicht wird und damit eine kürzere Halbwertszeit als die tatsächliche gemessen wird.

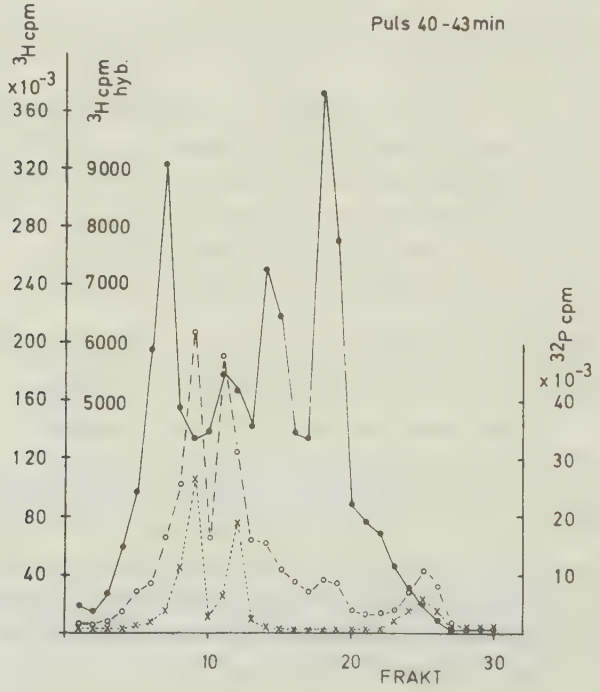

Abb. 15: Pulsmarkierung einer M13 infizierten Kultur. Ein unmarkiertes Aliquot (20 ml) der M13 infizierten Kultur, die für das in Abb. 13 beschriebene Puls-Chase Experiment verwendet wurde, erhielt einen ^{3}H-Uracil Puls (vergl. C 12.2.3) 40-43 min nach Infektion, anschließend ein Aliquot ^{32}P-markierter uninfizierter Zellen und wurde wie in Abb. 13 beschrieben aufgearbeitet. Die ^{3}H-Radioaktivitätswerte wurden mit Hilfe des internen ^{32}P-Standards nach Gelelektrophorese auf den 20 min Chase der Abb. 13 normalisiert.
o-o: TCA-fällbare ^{3}H-Radioaktivität
x-x: TCA-fällbare ^{32}P-Radioaktivität (interner Standard aus uninfizierten Zellen)
●-●: hybridisierte ^{3}H-Radioaktivität

Alle Radioaktivitätswerte sind in cpm/1.6 ml ausgedrückt.

Davon ausgehend, daß auf ein Gel die RNS aus maximal 10^8 Zelläquivalenten aufgegeben wurde und unter der hypothetischen Annahme, daß alle hybridisierbare Messenger RNS aus diesen Zelläquivalenten in einer einzigen Fraktion erscheint, müßten in einer infizierten Zelle ungefähr sechstausend Messenger RNS-Moleküle vorkommen, bevor die DNS-Sättigung in der entsprechenden Probe erreicht wird (bei 4 µg M13 RF II).

Jorgensen, Buch und Nierlich (1969) fanden bei der Identifizierung der 5'-Triphosphatenden von E. coli Messenger RNS bei 45 Sekunden dauernden ^{32}P-Markierungen, daß im Mittel eine Coli-Zelle zweitausend Messenger-Moleküle mit intaktem 5'-Ende enthält. Unter der Annahme, daß die biologische Halbwertszeit der ß-Galaktosidase Messenger RNS mit 0.7-1.15 Minuten (Kepes 1963) repräsentativ für die Masse der Coli-Messenger ist, sollten in einer Coli-Zelle weniger als viertausend Messenger-Moleküle vorliegen, wenn das Ereignis, das zur biologischen Inaktivierung einer Messenger RNS führt, die Abspaltung ihres 5'-Endes ist (Morikawa u. Imamoto, 1969; Morse, Baker u. Yanofsky, 1969; Kuwano, Schlessinger u. Apirion, 1970). Da sich nach M13 Infektion die Rate der Messenger RNS-Synthese nur unwesentlich ändert (Marvin u. Hohn, 1969, S. 197), erscheint damit die Annahme gerechtfertigt, daß die DNS-Sättigung nicht erreicht ist. Die Annahme wird durch den Befund gestützt, daß in ØX 174 infizierten Zellen 25 Minuten nach Infektion bei 37°C angenähert tausend Messenger RNS-Moleküle pro Zelle gefunden werden (Sedat u. Sinsheimer, 1970).

Die Halbwertszeitbestimmung der M13 spezifischen Messenger RNS erscheint damit genügend abgesichert. Diese Messenger RNS hat mit einer Halbwertszeit von 18 bis 19 Minuten eine für Phagen- und bakterielle Messenger RNS ungewöhnlich lange Lebensdauer. Für die Tryptophan-Messenger RNS wurde bei

30°C mit einem Chaseexperiment unter 1 mg/ml Uridin eine Halbwertszeit von 7-8 Minuten bestimmt (Morikawa u. Imamoto, 1969; siehe auch Imamoto u. Yanofsky, 1967 b). Ebenfalls 7-8 Minuten wurden für die Zerfallszeit (in der die Menge ursprünglich vorhandener RNS auf e^{-1} des Ausgangswerts zerfallen ist, für T_4 induzierte Messenger RNS gefunden (Bolle, Epstein, Salser u. Geiduschek, 1968). Die Halbwertszeit von Coli-Messenger RNS und lac-Messenger RNS wurde von Schwartz, Craig und Kennell (1970) bei 37°C gemessen. Sie betrug 2 Minuten 35 Sekunden.

Die aufgeführten Halbwertszeiten sind bis auf den von Schwartz, Craig und Kennell (1970) für Coli-Messenger bestimmten Wert (der an Hand der TCA-fällbaren Radioaktivität bestimmt wurde) durch Hybridisation gewonnen worden und sind deshalb mit der von M13 Messenger RNS direkt vergleichbar. Sie sind als physikalische Halbwertszeiten zu verstehen, denn ihr Wert hängt davon ab, wie lange die betroffene RNS mit einer bestimmten DNS Hybride eingehen kann, die noch bei Raumtemperatur stabil sind. Derartig definierte Halbwertszeiten sind naturgemäß länger als die biologischen - z.B. 0.7-1.15 Minuten (Kepes 1963) und 1 Minute 46 Sekunden für den ß-Galaktosidase-Messenger bzw. Transazetylase-Messenger (Schwartz, Craig u. Kennell, 1970), da wahrscheinlich schon die Abspaltung einer kurzen 5'-terminalen Sequenz für die biologische Inaktivierung einer Messenger RNS ausreicht (Morikawa u. Imamoto, 1969). Doch auch unter diesem Blickwinkel erscheint die Lebensdauer der M13 Messenger RNS ungewöhnlich lang. Was die Stabilisierung der M13 Messenger RNS in der infizierten Zelle bewirkt, ist unbekannt. Auf die mögliche Bedeutung der langen Halbwertszeit für die M13 Infektion wird in der Schlußdiskussion (D 5) noch näher eingegangen.

Während das "Puls-Chase" Experiment eine Auskunft über die metabolische Stabilität der M13 Messenger RNS gegeben hat,

konnte kein weiterer Aufschluß darüber erzielt werden, ob einzelne RNS-Spezies Aufbau- oder Degradationszwischenstufen bei der Synthese bzw. bei dem Abbau der anderen Spezies sind. Die Molekulargewichte der einzelnen Spezies entsprechen aufsummiert einer Molekülgröße, die mehr als einer Transkriptionsrunde auf der DNS-Matrize korrespondiert. Ein Modell, das mit diesem Befund vereinbar wäre, besagt, daß die einzelnen RNS-Spezies teilweise überlappende Sequenzen aufweisen (Okamoto, Sugiura u. Takanami, 1969). Nach diesem Modell, das für die in-vitro Transkription der fd-RF aufgestellt wurde, beginnt die RNS-Synthese an verschiedenen Initiationsstellen auf der DNS und verläuft bis zu einem gemeinsamen Terminationspunkt.

Eine andere Möglichkeit ist, daß die bisher beschriebenen, für die M13 Infektion spezifischen RNS-Spezies keine individuellen RNS-Moleküle sind sondern jeweils Komplexe aus mehreren RNS-Molekülen. Die auf Grund der elektrophoretischen Beweglichkeit ermittelten Molekulargewichte sind in diesem Fall die der Komplexe. Ihre Summe kann größer als das Molekulargewicht der DNS-Matrize sein und ebenfalls zu dem gefundenen Resultat führen. Diese Möglichkeit wird im nächsten Abschnitt (D 4) untersucht.

4 Aggregationskontrollen

In Tabelle II (D 2.2.4) wurde gezeigt, daß sich das Mengenverhältnis der beiden RNS-Spezies d und a mit dem Verlauf der Infektion charakteristisch verschiebt. Es wurde ferner gezeigt, daß früh nach Infektion der Anteil der Spezies mit einem Molekulargewicht von 1.3×10^6 im Vergleich mit der mit dem niedrigsten Molekulargewicht größer ist als zu späteren Zeiten. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß die kleineren RNS-Spezies keine unspezifischen Komplexe mit anderen RNS-Spezies eingehen. Denn im anderen Fall wäre zu erwarten, daß

z.B. bei 30-35 Minuten nach Infektion, einem Zeitraum, in dem an Hand des Prozentsatzes der hybridisierbaren Radioaktivität die stärkste Synthese M13 spezifischer Messenger RNS stattfindet, auch die Spezies mit dem Molekulargewicht 1.3×10^6 bevorzugt auftritt.

Obwohl auf Grund dieses Befundes eine unspezifische Aggregation weitgehend ausgeschlossen werden kann, ist damit nicht im positiven Sinn bewiesen, daß die gefundenen M13 Messenger RNS Spezies einzelne kovalent gebundene Polynukleotide sind. Z.B. kann nicht ausgeschlossen werden, daß sie durch Wasserstoffbrücken gebundene Komplexe aus mehreren Messenger RNS-Molekülen sind, die aus einem nicht näher bekannten Grund früh nach Infektion häufiger auftreten als zu später Zeit.

Mehrere Hinweise lassen den Schluß zu, daß eine Analyse von Messenger RNS-Größenverteilungen in Saccharosedichtegradienten und Polyacrylamidgelen durch Aggregatbildung verfälscht wird, die unabhängig von der in D 2.2 diskutierten Salzaggregation ist. Boedtker (1968 a) erwähnte das Auftreten von RNS-Aggregaten schon bei Salzkonzentrationen über 0.01 molar für einwertige und über 10^{-4} molar für mehrwertige Kationen und empfahl für genaue Molekulargewichtsbestimmungen, die Sekundärstruktur der RNS durch Behandeln mit Formaldehyd zu zerstören (Boedtker 1968 b).

Diese Art von Aggregation scheint, gemessen an den immer wieder in der Literatur auftauchenden breiten Hybridisationsprofilen, teilweise ohne eindeutiges Maximum, ein generelles Phänomen zu sein, z.B. bei ØX Messenger RNS (Warnaar, de Mol, Mulder, Abrahams u. Cohen, 1970; Sedat, Lyon u. Sinsheimer, 1969), Tryptophan-Messenger RNS (Imamoto u. Yanofsky, 1967 a; Morikawa u. Imamoto, 1969), Lambda-Messenger RNS (Kourilsky, Marcaud, Sheldrick, Luzzati u. Gros, 1968; Oda, Sakakibara u. Tomizawa, 1969), lac-Messenger RNS

(Attardi, Naono, Rouvière, Jacob u. Gros, 1963) und T_4 Lysozym-Messenger RNS (Salser, Gesteland u. Ricard, 1969).

Daß aber eine Aggregatbildung nicht regelmäßig mit einem heterogenen Verteilungsprofil einherzugehen braucht, wurde an der Aggregation von Fragmenten der TYMV-RNS gezeigt, die durch Alkalibehandlung des Virus erzeugt worden waren (Bosch, Bonnet-Smits u. van Duin, 1967). Die Aggregate ergaben eine scharfe Bande bei Saccharosegradientenzentrifugation, die in ihrem Molekulargewicht der intakten RNS entsprach, ließen sich jedoch durch kurzzeitiges Erhitzen auf 55°C, Behandeln mit Dimethylsulfoxid oder Entfernen aller mono- und divalenten Kationen durch Dialyse gegen verdünnte EDTA-Lösungen und schließlich gegen Wasser in RNS-Stücke mit einem Sedimentationskoeffizienten von 5s zerlegen.

Eine sehr spezifische Aggregatstruktur, die auch unter 0.2% SDS in der Gelelektrophorese erhalten blieb, zeigte Duesberg (1968) für die RNS des Rous-Sarkoma Virus. Nach kurzzeitiger Hitze- oder DMSO-Behandlung bzw. Sedimentation über einen DMSO-Gradienten (Strauss, Kelly u. Sinsheimer, 1968) wurde die RNS in kleinere Komponenten zerlegt, während NDV-RNS oder TMV-RNS nicht dissoziiert werden konnten.

Außer durch DMSO-Behandlung, für die gezeigt wurde, daß sie bei Raumtemperatur selbst vollständig doppelsträngige RNS denaturiert (Katz u. Penman, 1966), läßt sich die Sekundärstruktur von RNS durch kurzzeitiges Titrieren auf pH 3 zerstören (Cox 1968; Granboulan u. Scherrer, 1969), so daß auch unter diesen Bedingungen eine Aggregatstruktur aufgehoben wird.

Da die Interpretation der Molekulargewichte der M13 Messenger RNS-Spezies, die mit Hilfe der Gelelektrophorese gewonnen wurden, entscheidend von der möglichen Existenz von RNS-Aggregaten abhängt, wurden die M13 Messenger RNS-Spezies ver-

schiedenen Denaturierungsbedingungen wie Hitzeschock, Behandeln mit Dimethylsulfoxid und kurzzeitige Titration auf pH 3 unterworfen. Anschließend wurde ihr Molekulargewicht bestimmt.

4.1 Temperaturschock

RNS aus infizierten Zellen, die von 60-65 Minuten nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren (C 12.2.4), wurden in Puffer E/10 (C 2) eine Minute auf 100°C erhitzt, anschließend sofort im Eisbad abgeschreckt und auf einem dreiprozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 16). Zur Kontrolle wurde eine entsprechende Probe in demselben Puffer ohne vorhergehende Hitzebehandlung untersucht (Abb. 17).

Während im Kontrollgel sämtliche Komponenten (a, b, c und d) vorhanden sind, ist Komponente a nach der Hitzebehandlung nicht mehr sichtbar. Auch b_1 ist verschwunden, c zeigt eine Aufspaltung, und d ist die am stärksten vertretene M13 Messenger RNS-Spezies. Das Verschwinden von a und b_1 kann nicht als einfache Degradation erklärt werden, da die Menge des Materials, das kleiner als Spezies d ist, im Vergleich zu d im Kontrollgel nicht weiter angestiegen ist. Auch ist nicht zu erwarten, daß dieses Material aus dem Gel herausgewandert ist, da die Hybridisation im Vergleich zur Gesamtradioaktivität vor Erhitzen 3%, nach Erhitzen dagegen 5% betrug, also nicht abnahm.

Ob das Material, das langsamer als das Maximum der hybridisierbaren Radioaktivität in Abb. 16 wandert, native M13 Messenger RNS-Spezies darstellt oder eventuell Aggregate, die durch den Temperaturschock nicht irreversibel dissoziiert werden konnten, muß noch offen bleiben. M13 Messenger RNS Präparationen wurden deshalb im folgenden in DMSO-Gradienten untersucht. Denn DMSO kann, wie bereits ausgeführt, selbst vollständig doppelsträngige RNS denaturieren.

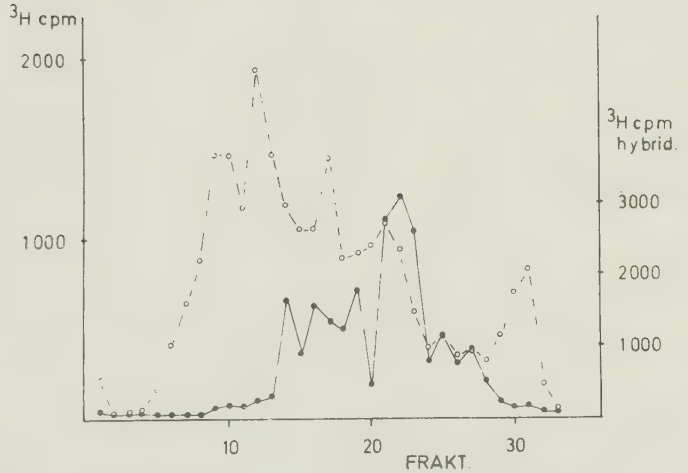

Abb. 16: Gelelektrophoretische Auftrennung von RNS aus M13 infizierten Zellen nach Hitzebehandlung. Die Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen, die von 60-65 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren (C 12.2.4), wurden 1:10 in Puffer E/10 verdünnt, 1 min auf 100°C erhitzt und sofort abgeschreckt. 100 µl der Probe wurden 2.25 Std. bei 5 mA/Gel auf einem dreiprozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Schneiden des Gels wurden die 2 mm-Scheiben mit je 2 ml 2xSSC, 0.5% SDS-Lösung eluiert. 0.08 ml jeder Fraktion wurden TCA-gefällt. 1.6 ml jeder Fraktion wurden 20 Std. bei 66°C mit 2 µg denaturierter M13 RF II/Filter hybridisiert.
o-o: TCA-fällbare Radioaktivität in cpm ^{3}H/ 0.08 ml
●-●: hybridisierbare Radioaktivität in cpm ^{3}H/ 1.6 ml

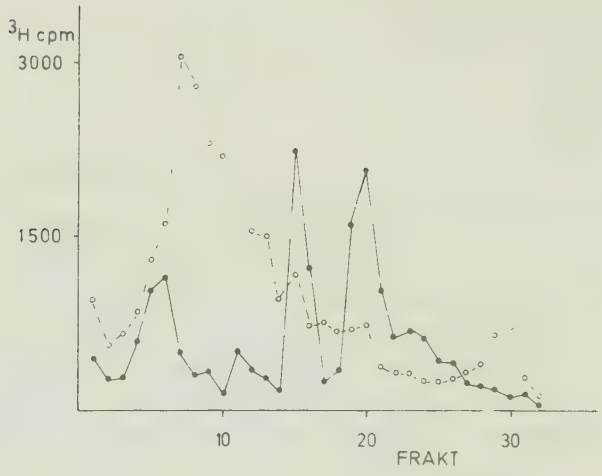

Abb. 17: Kontrolle zur Hitzebehandlung. Eine Probe wurde wie in Abb. 16 aufgearbeitet, jedoch ohne Hitzebehandlung. Symbole wie in Abb. 16.

4.2 Sedimentation in Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten

Die Analyse der M13 Messenger RNS im Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten erfolgte nach der von Sedat beschriebenen Methode (Sedat, Lyon u. Sinsheimer, 1969; Sedat u. Sinsheimer, 1970; vergl. C 18) auf linearen Gradienten, die aus 100% Hexadeuterodimethylsulfoxid, 10% (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA und 10% (v/v) Hexadeuterodimethylsulfoxid, 90% (v/v) Dimethylsulfoxid, 1 mM EDTA gemischt wurden. Dabei war beim Ansetzen der Lösungen zu beachten, daß sie unter Stickstoff hergestellt wurden, da sonst die Sedimentationsprofile unreproduzierbar waren und die RNS bei der Auftrennung wahrscheinlich oxidativ degradiert wurde. Die Hybridisation nach Fraktionieren des Gradienten erfolgte homogen (C 16) nach der von Warnaar, de Mol, Mulder, Abrahams und Cohen (1970) beschriebenen Methode.

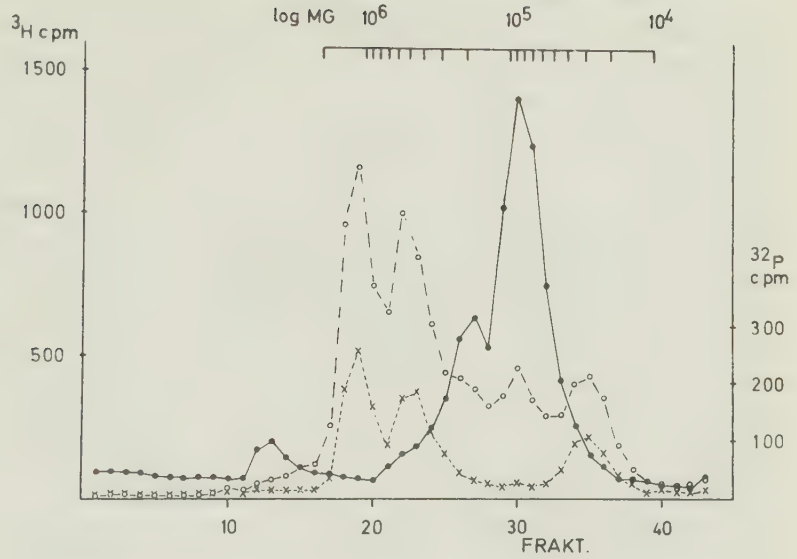

Abb. 18: Bandsedimentation von Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen in einem Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten. 10 µl Nukleinsäuren in 0.01m Tris, pH 7.8, 1 mM EDTA, 1% SDS aus M13 infizierten Zellen, die von 30-35 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren (vergl. C 12.2.4) wurden mit 10 µl Dimethylformamid und 180 µl Dimethylsulfoxid gemischt. Die Probe wurde auf einen linearen 5 ml Gradienten geschichtet, der 100-10% Hexadeuterodimethylsulfoxid und 10-0% Saccharose in Dimethylsulfoxid enthielt, und 17.5 Std. bei 50 000 upm und 20°C in einem SW 50.1-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Der Gradient wurde danach durch Abtropfen fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit SSC-Puffer verdünnt (C 16) und auf TCA-fällbare bzw. hybridisierbare Radioaktivität ausgetestet.
o-o: TCA-fällbare ^{3}H-Radioaktivität in cpm/0.1 ml
x-x: TCA-fällbare ^{32}P-Radioaktivität aus uninfizierten Zellen in cpm/0.1 ml
●-●: hybridisierbare ^{3}H-Radioaktivität in cpm/2 ml.
Die obere horizontale Skala gibt im logarithmischen Maßstab das Molekulargewicht der einzelnen Komponenten an.

Abb. 18 zeigt das Sedimentationsprofil von RNS aus infizierten Zellen mit anschließender Hybridisation. Die Zellen waren 30-35 Minuten nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden (analog C 12.2.4). Die Hauptmenge der hybridisierbaren Radioaktivität wandert zwischen der 16s ribosomalen RNS und Transfer-RNS mit einer relativ breiten Verteilung. Im Bereich vor der 23s ribosomalen RNS findet sich ein Nebenmaximum der hybridisierbaren Radioaktivität. Da die auf diesen Gradienten aufgegebenen Nukleinsäuren aber ebenfalls noch DNS enthielten, konnte diese Bande auch durch unspezifische Bindung mitmarkierter DNS an die Filter beim Hybridisationstest herrühren. Ein erhöhter Radioaktivitätsuntergrund, der sich bis zum Röhrchenboden hinzieht, verstärkt diesen Verdacht. Selbst wenn es sich bei diesem Gipfel um die in der Gelelektrophorese beobachtete Spezies a handeln sollte, hat ihr relativer Anteil an der Hybridisation stark abgenommen, so daß sie zumindest teilweise durch Aggregation zustande gekommen sein muß.

Zur Kontrolle, ob es sich bei dem restlichen schnell sedimentierenden Material tatsächlich um eine hochmolekulare Messenger RNS handelt oder lediglich um unspezifische Adsorption der während des Pulses mitmarkierten DNS, wurden die Nukleinsäuren vor Aufgeben auf den DMSO-Gradienten mit DNase behandelt. Der Probe wurde vor DNase-Behandlung einmal ^{32}P-markierte M12 RNS (C 8.2) zugesetzt, um ausschliessen zu können, daß Spezies a auf Grund einer verunreinigenden RNase-Aktivität degradiert wird (Abb. 20). Zum anderen wurde der Probe ^{32}P-markierte M13 (+)-Strang DNS (C 8.1) zugegeben, um zu kontrollieren, ob die DNase tatsächlich aktiv war (Abb. 19).

Die Auftrennungszeit wurde für diese Gradienten herabgesetzt, um möglichst keine Nukleinsäurekomponenten, die schneller als die 23s ribosomale RNS wandern, am Röhrchenboden zu verlieren. Dadurch ergibt sich im Bereich von der

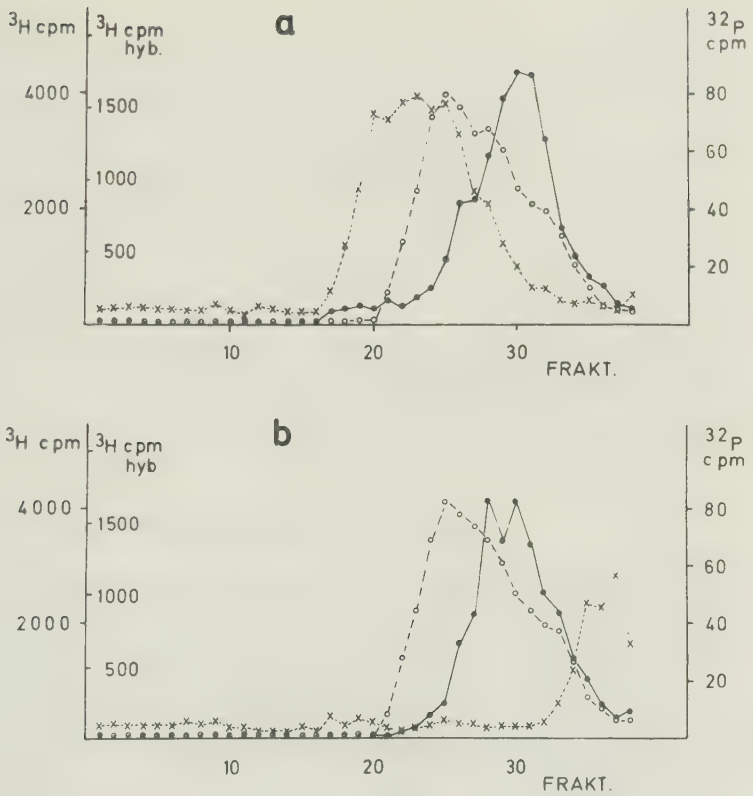

Abb. 19: Bandsedimentation von Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen in Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten vor und nach DNase-Behandlung. Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen, die von 30-35 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren (C 12.2.4), wurden mit ^{32}P-M13-Einzelstrang DNS gemischt. Die Probe b wurde in 5 mM Magnesiumchlorid mit 20 µg/ml RNase-freier DNase 30 min bei 37°C inkubiert. Die Probe a wurde sofort nach dem Ansetzen, die Probe b nach dem DNase-Verdau wie in Abb. 18 beschrieben mit Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid gemischt und auf einem 4 ml DMSO-Gradienten 7 Std. bei 56 000 upm und 27°C in einem SW 56 Ti-Rotor (Beckman) aufgetrennt. Fraktionieren der Gradienten und die Hybridisation erfolgten wie in Abb. 18 beschrieben.
o-o: TCA-fällbare ^{3}H-Radioaktivität in cpm/0.1 ml
x-x: TCA-fällbare ^{32}P-Radioaktivität in cpm/0.1 ml
●-●: hybridisierbare ^{3}H-Radioaktivität in cpm/Fraktion.

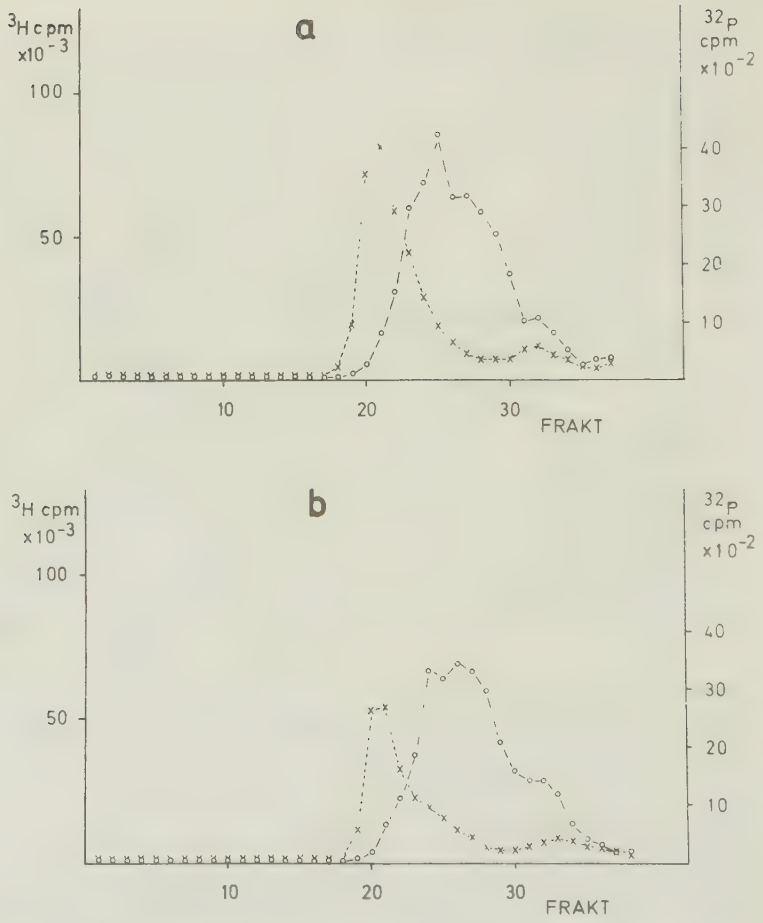

Abb. 20: Bandsedimentation von Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen in Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten vor und nach DNase-Behandlung (Kontrollversuch zu Abb. 19). Die in Abb. 19 beschriebenen Nukleinsäuren wurden mit ^{32}P-M12 RNS gemischt und die Probe b wie für Abb. 19 b beschrieben mit DNase inkubiert. Die Probe a wurde sofort nach dem Ansetzen, die Probe b nach dem DNase-Verdau wie in Abb. 18 beschrieben mit Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid gemischt und wie die Proben a und b in Abb. 19 auf einem DMSO-Gradienten aufgetrennt. Die Gradienten wurden nach dem Lauf direkt auf Papierfilter getropft (C 6.3) und nach TCA-Behandlung auf ihre Radioaktivität gemessen.
o-o: TCA-fällbare ^{3}H-Radioaktivität in cpm/Fraktion
x-x: TCA-fällbare ^{32}P-Radioaktivität in cpm/Fraktion.

23s ribosomalen RNS abwärts eine geringere Auftrennungsschärfe als in Abb. 18. Wie die Abb. 20 zeigt, wird während des DNase-Verdaus keine RNS degradiert; die verwendete DNase und die Probe sind somit RNase-frei. Die DNase hat gewirkt, wie die Verschiebung des M13 DNS-Maximums in Abb. 19 zeigt. In Abb. 19 wird ferner eine praktisch identische Verteilung der hybridisierbaren Radioaktivität im Bereich zwischen der 16s ribosomalen RNS und Transfer-RNS gefunden, doch ist das Maximum der im Hybridisationstest gefundenen Radioaktivität vor der 23s ribosomalen RNS nach DNase-Verdau verschwunden. Damit ist gezeigt, daß diese Komponente durch kontaminierende DNS hervorgerufen wurde und nicht eine M13 spezifische Messenger RNS ist.

4.3 Kurzzeitige Titration auf pH 3

Um die Aggregation der M13 Messenger RNS durch eine von den DMSO-Dichtegradienten unabhängigen Methode zu untersuchen, die unter milden Bedingungen arbeitet, so daß nicht mit einer unspezifischen Degradation der RNS gerechnet werden braucht, wurden die Nukleinsäuren vor Aufgeben auf die Gelelektrophorese für dreißig Sekunden auf pH 3 gebracht (Cox 1968; Granboulan u. Scherrer, 1969). Durch die kurzfristige Titration der Wasserstoffbrückenbindungen wird die Sekundärstruktur der Nukleinsäuren aufgehoben, so daß verborgene Strangbrüche aufgedeckt werden und durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehaltene Aggregate auseinander fallen. Nach dreißig Sekunden wurden die Nukleinsäuren neutralisiert (C 19). Eine Kontrollprobe wurde derart hergestellt, daß die Nukleinsäuren zuerst mit der zur Neutralisation erforderlichen Puffermenge und dann mit der verdünnten Salzsäure gemischt wurden, die für die Titration notwendig war.

Abb. 21 zeigt die elektrophoretische Auftrennung und Hybridisation der Nukleinsäuren nach dem pH-Sprung, Abb. 22 das

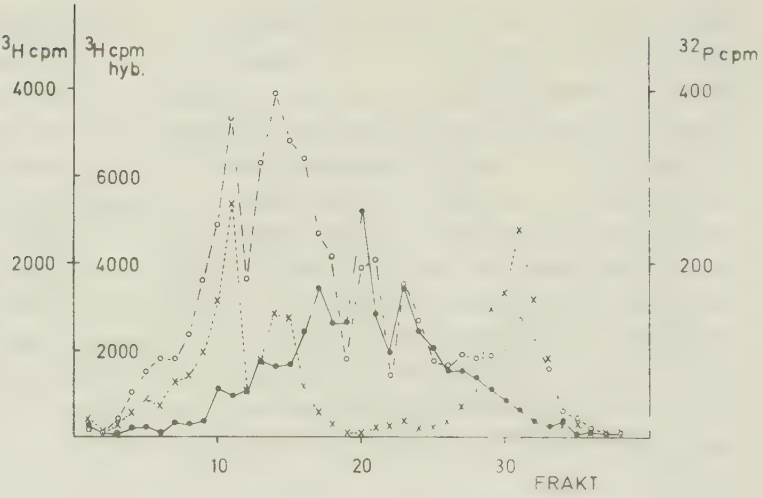

Abb. 21: Gelelektrophoretische Auftrennung von RNS aus M13 infizierten Zellen nach kurzzeitiger Titration auf pH 3. Nukleinsäuren aus M13 infizierten Zellen, die von 30-35 min nach Infektion mit ^{3}H-Uracil pulsmarkiert worden waren (vergl. Abb. 19), wurden wie in C 19 beschrieben für 30 Sekunden auf pH 3 gebracht und reneutralisiert. Nach Zugabe von Nukleinsäuren aus ^{32}P-markierten uninfizierten Zellen als Markierungssubstanz wurden 0.1 ml dieser Probe 2.25 Std. bei 5 mA/Gel auf einem dreiprozentigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Schneiden des Gels und Elution der 2 mm-Scheiben mit je 2 ml 2xSSC, 0.5% SDS-Lösung wurde die TCA-fällbare Radioaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt. 1.6 ml jeder Fraktion wurden 20 Std. bei 66°C mit 2 µg denaturierter M13 RF II/Filter hybridisiert.
o-o: TCA-fällbare ^{3}H-Radioaktivität in cpm/0.08 ml
x-x: TCA-fällbare ^{32}P-Radioaktivität in cpm/0.08 ml
●-●: hybridisierbare ^{3}H-Radioaktivität in cpm/1.6 ml

Kontrollprofil. Während im Kontrollversuch im wesentlichen dieselben Spezies wiedergefunden werden wie in Abb. 11 (eine Auftrennung, die mit der unbehandelten Probe unter den dort

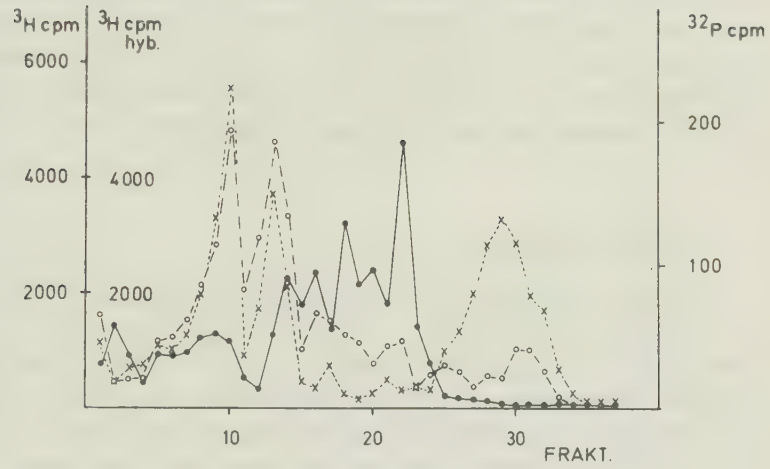

Abb. 22: Kontrolle zur kurzfristigen Titration auf pH 3. Eine Probe wurde wie die in Abb. 21 aufgearbeitet, erhielt aber zuerst die zur Reneutralisation erforderliche Puffermenge und dann die verdünnte Salzsäure (C 19). Symbole wie in Abb. 21.

verwendeten Pufferbedingungen durchgeführt wurde, ergab ein deckungsgleiches Profil), ist die Verteilung der hybridisierbaren Radioaktivität in Abb. 21 deutlich verschoben. Sie ist breiter geworden und weist im Gebiet zwischen Meniskus des Gels und 23s ribosomaler RNS keine Komponente auf. Die Verbreiterung des Profils wird dahingehend interpretiert, daß RNS-Moleküle verschiedener Größe, die vorher durch Aggregatbildung als homogene Bande auftraten, durch die Titration freigesetzt worden sind. Das Hybridisationsprofil zeigt eine Gliederung im Bereich der ursprünglichen Spezies b_2, c und d, die sich angedeutet auch in den DMSO-Gradienten findet. Zur Zeit kann nicht entschieden werden, ob sich in der stärkeren Gliederung die höhere Trennschärfe der Polyacrylamidgelelektrophorese widerspiegelt oder im Gegensatz zum

DMSO-Gradienten einige Aggregatstrukturen durch diese Methode nicht irreversibel denaturiert werden können. Da das Sedimentationsprofil im DMSO-Gradienten für die M13 Messenger RNS im Vergleich mit den ribosomalen RNS jedoch relativ sehr breit ist, wird die erste Interpretation bevorzugt.

5 Schlußdiskussion

5.1 Strangspezifität der M13 Messenger RNS

Durch Hybridisation mit M13 RF-DNS bzw. mit M13 (+)-Strang DNS wurde gezeigt, daß die M13 spezifische in-vivo Messenger RNS dem (+)-Strang der M13 RF homolog ist und damit dieselbe Strangspezifität hat wie die Messenger RNS eines anderen einsträngigen DNS-Phagen, ØX 174. Die Homologie zwischen (+)-Strang und Messenger RNS verändert sich nicht nachweisbar im Verlauf der Infektion. Auf Grund dieser Befunde kann geschlossen werden, daß bei einer kleinen zirkulären DNS, deren Informationsgehalt nur acht bis maximal zehn Genen entspricht, nicht wie bei den großen DNS-Phagen (z.B. Lambda und T_4) eine Art "Früh-Spät" Regulation wirkt, so daß einige Gene früh nach Infektion von dem einen Strang, andere spät nach Infektion jedoch vom Gegenstrang transkribiert werden.

Die ausschließliche Homologie zwischen (+)-Strang DNS und Messenger RNS bei der in-vitro Transkription wurde für ØX 174 schon früher bestätigt. Eine notwendige Voraussetzung für dieses Ergebnis ist jedoch, daß die als Matrize benutzte RF-DNS nativ und in beiden Strängen kovalent geschlossen ist oder nur wenige Einzelstrangbrüche aufweist (Hayashi, Hayashi u. Spiegelman, 1964; Warnaar, Mulder, van den Sigtenhorst-van der Sluis, van Kesteren u. Cohen, 1969). Kürzlich konnten Sugiura und Mitarbeiter (Sugiura, Okamoto u. Takanami, 1969) auch für die Replikative-Form DNS des filamentösen Phagen fd

bestätigen, daß die in vitro an fd-RF synthetisierte Messenger RNS homolog zum (+)-Strang ist. Die früher beobachtete symmetrische in-vitro Transkription der ØX RF ließ sich darauf zurückführen, daß die als Matrize verwendete RF-DNS physikalisch nicht mehr genügend intakt war (Chamberlin u. Berg, 1962; Hayashi, Hayashi u. Spiegelman, 1963 b).

Diese Ergebnisse zeigten die Homologie zwischen einem Strang der DNS-Matrize und einer für die Infektion spezifischen Klasse von Messenger RNS, ausgehend von der Vorstellung, daß für die genetische Steuerung der Proteinsynthese die Information der DNS über eine Messenger RNS an den Ort der Proteinsynthese gelangt (Brenner, Jacob u. Meselson, 1961). Im scheinbaren Widerspruch dazu stehen Experimente über die Translatierbarkeit von fd-(+)-Strang DNS. Bretscher (1968) konnte zeigen, daß in Gegenwart streptomyzinoider Antibiotika, in der einzelsträngige DNS in vitro direkt translatierbar wird (McCarthy u. Holland, 1965), auch der zirkuläre fd-(+)-Strang die in-vitro Proteinsynthese stimuliert und selbst ohne solche Antibiotika in Gegenwart von GTP mit Formylmethionin Transfer-RNS an Ribosomen bindet (Bretscher 1968; vergl. auch Ihler u. Nakada, 1970) und zur Synthese einiger Oligopeptide führt (Bretscher 1969). Doch zeigen die bereits in D 1 angeführten Versuche zur Suppression von fd amber-Mutanten mit 5-Fluoruracil, daß der Informationsfluß von M13 DNS in vivo zumindest teilweise über eine Messenger RNS erfolgen muß. Gegen die Hypothese, daß der (+)-Strang in vivo direkt zur Proteinsynthese ohne zwischengeschaltete Messenger RNS Synthese benutzt wird, spricht weiterhin der Befund, daß der (+)-Strang unmittelbar nach Infektion von einem wirtseigenen Enzym in die doppelsträngige RF-DNS umgewandelt wird und deshalb für die direkte Translation nicht mehr zur Verfügung steht.

Ungeklärt ist bislang das Auftreten von RNS-Spezies in uninfizierten Zellen, die mit M13 RF hybridisieren können. Ein ähnlicher Befund wurde von Warnaar und Mitarbeitern (Warnaar, de Mol, Mulder, Abrahams u. Cohen, 1970) berichtet, die ebenfalls in uninfizierten Zellen RNS-Spezies nachweisen konnten, die mit ØX RF hybridisierten. Sedat und Sinsheimer (1970) zeigten, daß bei der Bandsedimentation von RNS aus uninfizierten Zellen in DMSO-Dichtegradienten hybridisierte Radioaktivität an ØX RF-beladenen Filtern gefunden wird, die um den Faktor zwei bis drei über der an Leerfiltern anhaftenden liegt und ausschließlich im Molekulargewichtsbereich zwischen 20 000 und 30 000 auftritt. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, führte die mit M13 RF hybridisierende RNS aus uninfizierten Zellen ebenfalls zu einer lediglich um den Faktor drei über dem unspezifischen Radioaktivitätsuntergrund liegenden Hybridisation. Sie störte bei den Untersuchungen über die Größenverteilung der M13 spezifischen Messenger RNS nicht, da sie im allgemeinen bei den verwendeten Auftrennungszeiten bereits aus den Gelen herausgewandert war und deshalb bei der anschliessenden Hybridisation nicht mehr erfaßt wurde.

5.2 Lebensdauer der M13 Messenger RNS

Die zum (+)-Strang der M13 RF homologe Messenger RNS hat, wie durch ein "Puls-Chase" Experiment bestimmt wurde, eine für das Coli-System ungewöhnlich lange Halbwertszeit von achtzehn bis neunzehn Minuten bei 37^{o}C, während Coli-Messenger im allgemeinen Halbwertszeiten von nur wenigen Minuten aufweisen. Im Zusammenhang mit den technischen Details des Experiments (D 3) wurden die möglichen Fehlerquellen bereits diskutiert, die zu einer Verfälschung der gemessenen Halbwertszeit führen könnten. Es ließ sich jedoch ausschließen, daß einerseits eine Nachinkorporation von radioaktivem Uracil zu einer Überschätzung und andererseits eine beim Hybridisationstest mögliche DNS-Sättigung

zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Lebensdauer der M13 Messenger RNS führte. An dieser Stelle soll ein systematischer Fehler diskutiert werden, der unabhängig von jenen beiden Fehlermöglichkeiten das Meßergebnis erheblich beeinflussen könnte: Der Messung von RNS-Halbwertszeiten mit Hilfe eines "Puls-Chase" Experiments haftet nämlich insofern eine gewisse Unsicherheit an, als mit dieser Methodik eine eventuell stattfindende interne Reinkorporation radioaktiver RNS-Vorstufen aus vorher markierter und anschließend degradierter Messenger RNS in neu gebildete Messenger RNS nicht kontrolliert werden kann. Wenn der Fluß dieses Materials nicht über den allgemeinen Uracil- und Uridinpool der Zelle laufen sollte, ist er durch die von außen zugegebene überschüssige Menge an unmarkiertem Uracil und Uridin wahrscheinlich nur langsam beeinflußbar.

Verschiedene Experimente, die von anderen Autoren mit von einander unabhängigen Methoden durchgeführt wurden, zeigen jedoch, daß die Halbwertszeitbestimmung von Messenger RNS mit Hilfe eines Puls-Chase Experiments im wesentlichen mit anderen Methoden übereinstimmende Ergebnisse ergibt. Morikawa und Imamoto (1969) bestimmten mit einem Chase von 1 mg/ml Uridin bei 30°C die Halbwertszeit der Tryptophan-Messenger RNS mit 7-8 Minuten. Dieser Wert stimmt mit dem durch Derepression und Repression des Tryptophanoperons gewonnenen (Morse, Mosteller, Baker u. Yanofsky, 1969) gut überein. Für die Halbwertszeit von Coli-Messenger RNS bei 25°C wurde nach Pulsmarkierung und Waschen der Zellen mit einem Chase von 20 µg/ml Uridin eine mittlere Halbwertszeit von acht Minuten gemessen (Lindahl u. Forchhammer, 1969), wobei sich die Wachstumsgeschwindigkeiten bei 37°C und 25°C in vergleichbaren Medien um den Faktor 2.2 unterscheiden.

Einen anderen Weg zur Bestimmung der Halbwertszeit von Coli-Messenger RNS beschritten Schwartz, Craig und Kennell (1970).

Sie blockierten die Transkription nach Pulsmarkierung durch Rifampicin, ein Antibiotikum, das sich an die DNS-abhängige RNS-Polymerase anlagert und nur noch die Fertigstellung der in Synthese begriffenen RNS-Ketten, aber keine Reinitiation gestattet (di Mauro, Snyder, Marino, Lamberti, Coppo u. Tocchini-Valentini, 1969) und maßen die Abnahme der Radioaktivität in der Gesamt-RNS bzw. in der an lac-DNS hybridisierbaren RNS. Sie fanden für Coli-Messenger RNS bei 37°C eine Halbwertszeit von 2 Minuten 35 Sekunden, die der für die lac-Messenger RNS bestimmten genau entsprach. Diese beiden Werte liegen in vergleichbarer Größenordnung mit dem von Lindahl und Forchhammer (1969) durch ein Puls-Chase Experiment bei 25°C gefundenen.

Daß eine interne Reinkorporation von Uracil aus degradierter Messenger RNS wahrscheinlich einen vernachlässigbaren Einfluß auf die Halbwertszeitbestimmung einer Messenger RNS hat, vertraten außerdem Lindahl und Forchhammer (1969). Sie untersuchten den UTP-Pool von Coli-Zellen bei Aushungern der Zellen gegen Uracil und fanden, daß unter diesen Bedingungen der UTP-Pool mit einer Halbwertszeit von zwei Minuten bei 37°C abnimmt, um schließlich auf 1 bis 3% des Wertes stehen zu bleiben, der bei exponentiell wachsenden Zellen gemessen wird. Damit erscheint die Annahme genügend abgesichert, daß mit Hilfe eines Puls-Chase Experiments die Halbwertszeitbestimmung einer Messenger RNS im Prinzip exakt durchzuführen ist.

Bisher wurde lediglich eine weitere für das Coli-System ungewöhnlich lange Halbwertszeit von zwanzig bis dreißig Minuten für die Messenger RNS von Coli-Zellen berichtet, die mit dem doppelsträngigen DNS-Phagen T_7 infiziert waren (Summers 1970). Das Ergebnis scheint aber aus den folgenden Gründen nicht verläßlich zu sein: Die Halbwertszeit wurde nach ^3H-Uridinmarkierung durch Hemmung der Transkription mit Rifampicin bzw. mit Actinomycin in Verbindung mit einem Chase von

100 µg/ml Uridin gemessen. Da jedoch nach T_7-Infektion in der infizierten Zelle eine T_7-spezifische DNS-abhängige RNS-Polymerase synthetisiert wird (Chamberlin, McGrath u. Waskell, 1970), die rifampicinresistent ist (Herrlich u. Schweiger, 1971), sagt die Messung der Radioaktivität in T_7-Messenger RNS nach Rifampicingabe nichts über ihre Halbwertszeit aus. Die Messung der Halbwertszeit der Coli-Messenger RNS nach Rifampicingabe geschah zu einer Zeit, bei der die Transkription des Wirts auf die phagenspezifische umgestellt war (Summers u. Siegel, 1970), denn die in einem Zweiminutenpuls markierte RNS bestand zu mindestens 95% aus T_7-spezifischer RNS. Da schließlich der Kontrollversuch mit Actinomycin unter der stillschweigenden Voraussetzung durchgeführt wurde, daß durch die T_7-Infektion nicht die Permeabilität für Actinomycin geändert wird und - ohne vorhergehendes Waschen der Zellen - ein Chase von nur 100 µg/ml ausreicht, um jede weitere Inkorporation von radioaktivem Uridin zu verhindern, erscheint die gefundene lange Halbwertszeit für dieses System zumindest als fraglich.

Damit weist die M13 spezifische Messenger RNS die bisher längste für das Coli-System berichtete Halbwertszeit von 18-19 Minuten auf. Diese Halbwertszeit entspricht 0.6 Generationszeiten des Wirtsstammes bei 37°C in dem verwendeten Medium.

5.3 Größenverteilung der M13 Messenger RNS

Für die in vivo synthetisierte M13 spezifische Messenger RNS wurde bei der Sedimentation in einem Dimethylsulfoxid-Dichtegradienten, in dem die Sekundärstruktur von Nukleinsäuren vollkommen aufgehoben ist, ein breites, heterogenes Radioaktivitätsprofil gefunden. Für die in-vivo ØX Messenger RNS wurde ebenfalls bei DMSO-Gradientenzentrifugation eine breite Verteilung berichtet, die ihr Maximum bei einem Molekulargewicht von 2×10^5 hat und sich bis zu einem

oberen Molekulargewicht von $1.5\text{-}1.7 \times 10^6$ erstreckt (Sedat u. Sinsheimer, 1970). Es konnte gezeigt werden, daß dieses Verteilungsmuster durch verschiedene Größenklassen von Messenger RNS hervorgerufen wurde. Denn Proben aus verschiedenen Bereichen des Profils bandeten bei Rezentrifugation an ihrer früheren Position und ergaben nicht eine ähnlich breite Verteilung, wie vorher beobachtet (Sedat u. Sinsheimer, 1970).

Wenn das Hybridisationsprofil der M13 Messenger RNS nach DMSO-Gradientenzentrifugation durch Auftragen der gewanderten Entfernung gegen den Logarithmus des Molekulargewichts ausgewertet wird (Strauss, Kelly u. Sinsheimer, 1968; Sedat u. Sinsheimer, 1970), kann unter der Annahme, daß auch bei M13 Messenger RNS das heterogene Verteilungsprofil durch verschiedene Größenklassen von RNS-Molekülen hervorgerufen wird, dem Maximum der Verteilung ein Molekulargewicht von 9×10^4 zugeordnet werden (Abb. 18). Der oberen Grenze der Verteilung entspricht dann ein Molekulargewicht von $4\text{-}5 \times 10^5$.

Die Größenverteilungen von ØX 174 und M13 Messenger RNS sind damit grundsätzlich anders zu interpretieren. Während für ØX 174 ein polycistronischer Messenger voller Genomlänge gefunden wird und die breite Verteilung wahrscheinlich durch die Degradationsprodukte dieser RNS erzeugt wird, existiert bei M13 nur eine obere Messengergröße von 4-500 000.

Das mittlere Molekulargewicht der M13 Messenger RNS, das aus dem DMSO-Gradienten ermittelt wird (9×10^4), stimmt gut mit dem der Spezies d überein (1×10^5), das an Hand der elektrophoretischen Beweglichkeit in Polyacrylamidgelen bestimmt wurde. Eine plausible Erklärung für die Hybridisationsprofile im DMSO-Gradienten und in der Gelelektrophorese wäre, daß in M13 infizierten Zellen pha-

genspezifische Messenger RNS-Moleküle mit bis zu $5x10^5$ ansteigendem Molekulargewicht existieren, die aus einem nicht näher bekannten Grund aggregieren und so die Spezies a bis c erzeugen.

Daß ein Messenger mit dem Molekulargewicht $9x10^4$ existiert, ist nicht unmöglich. Das Produkt, das ein derart kleiner Messenger kodieren könnte, ist entweder das Hüllprotein des Phagen mit 49 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 5169 (Beyreuther 1968) oder das Gen 5-Produkt mit einem Molekulargewicht von 8 000 (Henry u. Pratt, 1969). Daß Spezies d zu der Zeit nach Infektion (Tabelle II, D 2.2.4) bevorzugt auftritt, wenn das Gen 5-Produkt für die Einzelstrangsynthese und das Hüllprotein für die Produktion reifer Phagen in großer Menge gebraucht werden, bestärkt diese Annahme. Diese beiden Genprodukte treten in infizierten Zellen in hohen Titern auf. Das Gen 5-Produkt liegt 35 Minuten nach Infektion in 1000 bis 10 000 Kopien pro Zelle vor (Henry u. Pratt, 1969). Vom Hüllprotein, Produkt des Gen 8, werden pro infizierte Zelle bis zu 20 000 Kopien gefunden (Beyreuther 1968; Marvin u. Hohn, 1969). Die lange Halbwertszeit der M13 Messenger RNS könnte dahingehend gedeutet werden, daß die Produktion dieser in hoher Quantität gebrauchten Proteine über stabile Messenger RNS erfolgt.

Diese Zuordnung ist jedoch keineswegs zwingend. Eine andere durchaus plausible Erklärung ist, daß Messenger-Fragmente dieser Größe Zwischenstufen bei der Degradation größerer Messenger RNS darstellen und eine höhere Halbwertszeit aufweisen, als sie Coli-Messenger im allgemeinen haben.

Das Modell von Morikawa und Imamoto (1969) über den Abbau von Messenger RNS beinhaltet, daß eine RNS schon während ihrer Transkription translatiert wird und, nachdem eine Welle von ungefähr hundert Ribosomen über sie hinweg gelaufen ist, bereits die Degradation der RNS einsetzt. Daraus wird gefolgert, daß nur sehr wenige Messenger RNS-Moleküle je-

mals in ihrer vollen Länge gefaßt werden können, sondern hauptsächlich ihre Fragmente. Bei Anwendung dieser Modellvorstellung entspricht die obere Verteilungsgrenze der hybridisierbaren Radioaktivität im DMSO-Gradienten der maximalen Länge M13 spezifischer Messenger RNS, das Maximum der Verteilung einer bevorzugt auftretenden Fragmentgröße. Diesem Profil könnten die Degradationsprofile anderer M13 Messenger mit einer Maximallänge kleiner als $5x10^5$ überlagert sein.

Eine maximale Messengergröße von $5x10^5$ würde angenähert noch mit dem größten bisher identifizierten phagenspezifischen Polypeptid korrespondieren. Dieses als Gen 3-Produkt bezeichnete Protein (das "A-Protein"), das als Hüllproteinbestandteil in einer Kopie pro M13 Phage auftritt, hat ein Molekulargewicht von 70 000 (Henry u. Pratt, 1969).

Die Möglichkeit, daß die Molekulargewichtsverteilung von $5x10^5$ abwärts eine völlig artifizielle Degradation von dem Zeitpunkt an darstellt, an dem die Zelle nach einer radioaktiven Markierung auf geeisten Puffer gegeben wurde, bis zur vollen Wirkung von Detergens und Phenol, ist unwahrscheinlich, da reproduzierbar dieselben Radioaktivitätsprofile bei verschieden langen Wasch- und Aufarbeitungsschritten gewonnen wurden. Außerdem wurden sämtliche Untersuchungen in einem RNase I^--Stamm durchgeführt, um eine derartige unspezifische Degradation von vornherein zu vermeiden.

Die Aggregatbildung ist im wesentlichen noch unverstanden, da sie zu frühen Zeiten nach Infektion offensichtlich bevorzugt ist und damit kein reines Aufarbeitungsartefakt sein kann. Es ist nicht unmöglich, daß diesen Komplexen eine spezifische Rolle bei der Transkription des Phagen zukommt, jedoch ist diese Vermutung eine reine Hypothese. Möglicherweise spielt beim Zustandekommen der Komplexe die räumliche Nachbarschaft der Messenger RNS-Moleküle während

der Transkription eine ähnliche Rolle wie bei der in-situ Aggregation der TYMV-RNS bei Alkalifragmentierung (Bosch, Bonnet-Smits u. van Duin, 1967).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Resultate stehen im wesentlichen im Einklang mit den bei der in-vitro Transkription an fd-RF erhobenen Befunden (Takanami, Okamoto u. Sugiura, 1970). In Anwesenheit des Transkriptionsterminationsfaktors Rho (Roberts 1969) fanden die Autoren drei verschiedene Polynukleotide mit den Anfangssequenzen pppAp-UpG..., pppGpUpU... und pppGpUpA..., die im Saccharosedichtegradienten mit einem Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 10s wanderten und ein angenähertes Molekulargewicht von $4x10^5$ haben.

5.4 Ausblick auf weiterführende Arbeiten

Die in der vorliegenden Arbeit geschilderten Untersuchungen zur Charakterisierung der M13 spezifischen in-vivo Messenger RNS lassen sich durch die im folgenden beschriebenen Experimente ergänzen und fortführen. Ziel dieser Experimente ist, die in dieser Arbeit begonnene Größenbestimmung der M13 Messenger RNS weiter zu präzisieren.

1) Durch Messung der intakten 5'-Enden der M13 Messenger RNS nach DMSO-Gradientenzentrifugation und Hybridisation sollte es trotz der dabei beobachteten heterogenen Verteilung der hybridisierbaren Radioaktivität möglich sein, diskrete Messengergrößen festzustellen. Wie weiter oben bereits erwähnt, weisen die Coli-Messenger in vivo ein 5'-Triphosphatende auf (Jorgensen, Buch u. Nierlich, 1969). Dasselbe sollte für M13 Messenger RNS zutreffen. Durch einen sehr kurzen ^{32}P-Phosphatpuls (45 Sekunden) wird bei Coli-Messengern hauptsächlich das 5'-Triphosphatende in Gammastellung markiert (Jorgensen, Buch u. Nierlich, 1969), so daß mit dieser Technik intakte 5'-Termini von Messenger RNS gemes-

sen werden können. Die Hybridisation mit M13 RF erlaubt, zwischen M13 Messenger RNS und Coli-Messenger RNS zu differenzieren. Um die Ausbeute an 5'-Triphosphatenden der M13 Messenger RNS zu erhöhen, sollte die Isolierung der M13 Messenger RNS aus einem Bakterienstamm vorgenommen werden, der für alkalische Phosphatase negativ ist (Takanami 1966).

Während es mit diesem Ansatz möglich sein sollte, die Maximallänge der M13 Messenger RNS Komponenten unabhängig von der bereits in vivo einsetzenden Degradation zu bestimmen - unter der Voraussetzung, daß es wenigstens einige intakte mit 5'-Triphosphatenden gibt - sollte der folgende Weg zu einer Bestimmung der in vivo an der RF-DNS wirksamen RNS-Initiationsstellen führen:

2) Nach Infektion eines Uracil-negativen Wirts mit einer ^{3}H-Thymin markierten M13 Mutante in Gen 2, bei der nur noch die Bildung der parentalen RF abläuft, nicht dagegen die Bildung von Tochter-RF, wird die Transkription durch Zugabe von Uracil gestartet. Nach Befunden von Henry und Pratt (1969) läuft die Transkription an der parentalen RF ab. Kurz darauf werden zu der Kultur Chloramphenicol und Streptolydigin gegeben, um die initiierten RNS-Ketten durch Hemmung der Transkription und Translation vor Degradation zu schützen. Der Transkriptionskomplex wird durch milde Detergensbehandlung der Zellen und Zentrifugation des Lysats über einen Saccharosedichtegradienten isoliert. Nach Phenolisieren werden die 5'-Enden der initiierten RNS-Ketten durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und anschließend selektiv durch ^{32}P-Orthophosphattransfer von γ-^{32}P-ATP mit Polynukleotidkinase (Takanami 1966; Weiss u. Richardson, 1966) erschöpfend markiert. Aus dem Verhältnis der ^{32}P-Markierung zur ^{3}H-Markierung, die bei Kenntnis der spezifischen ^{3}H-Radioaktivität ein Maß für die Zahl der transkribierten RF-Moleküle ist, läßt sich

eine Aussage über die Zahl der Transkriptionsinitiationsorte auf der RF-DNS in-vivo machen.

Mit diesen beiden Experimenten sollten sich die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde ergänzen und erweitern lassen. Das zweite Experiment könnte außerdem zur 5'-terminalen Sequenzierung der in-vivo M13 Messenger RNS führen und die DNS-Sequenzierung der M13 RF komplementieren, die zur Zeit in anderen Laboratorien in Angriff genommen wird.

E. Literaturverzeichnis

Albertson, P.Å. (1962). Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 264.

Albertson, P.Å. (1965). Biochim. Biophys. Acta, 103, 1.

Anderson, N.G. (1966). Nat. Cancer Inst. Monograph, 21, 9.

Asano, K. (1965). J. Mol. Biol. 14, 71.

Astrachan, L. u. Volkin, E. (1958). Biochim. Biophys. Acta, 29, 536.

Attardi, G., Naono, S., Rouvière, J., Jacob, F. u. Gros, F. (1963). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 363.

Avery, O.T., MacLeod, C.M. u. McCarty, M. (1944). J. Exptl. Med. 79, 137.

Bautz, E.K.F. u. Hall, B.D. (1962). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 48, 400.

Benzinger, R. (1969). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1266.

Beyreuther, K. (1968). Doktorarbeit Universität München.

Bishop, D.H.L., Claybrook, J.R. u. Spiegelman, S. (1967). J. Mol. Biol. 26, 373.

Boedtker, H. (1968 a). In: Methods in Enzymology, Vol. XII B. Ed. by Grossman, L. and Moldave, K. New York: Academic Press Inc.

Boedtker, H. (1968 b). J. Mol. Biol. 35, 61.

Bolle, A., Epstein, R.H., Salser, W. u. Geiduschek, E.P. (1968). J. Mol. Biol. 31, 325.

Bolton, E.T. u. McCarthy, B.J. (1962). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 48, 1390.

Bonhoeffer, F. (1966). Z. Vererbungslehre 98, 141.

Bosch, L., Bonnet-Smits, E.M. u. van Duin, J. (1967). Virology 31, 453.

Brenner, S., Jacob, F. u. Meselson, M. (1961). Nature (London) 190, 576.

Bretscher, M.S. (1968). Nature (London) 220, 1088.

Bretscher, M.S. (1969). J. Mol. Biol. 42, 595.

Brown, J.L., Brown, D.M. u. Zabin, I. (1967). J. Biol. Chem. 242, 4254.

Budman, D.R. u. Pardee, A.B. (1967). J. Bact. 94, 1546.

Chamberlin, M. u. Berg, P. (1962). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 48, 81.

Chamberlin, M., McGrath, J. u. Waskell, L. (1970). Nature (London) 228, 227.

Champe, S.P. u. Benzer, S. (1962). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 48, 532.

Choules, G.L. u. Zimm, B.H. (1965). Analyt. Biochem. 13, 336.

Cohen, S.S., Flaks, J.G., Barner, H.D., Loeb, M.R. u. Lichtenstein, J. (1958). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 44, 1004.

Cox, R.A. (1968). Biochem. J. 106, 725.

Denhardt, D.T., Dressler, D.H. u. Hathaway, A. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 57, 813.

Duesberg, P.H. (1968). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 60, 1511.

Fiers, W. u. Sinsheimer, R.L. (1962). J. Mol. Biol. 5, 424.

Franklin, R.M. (1966). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 55, 1504.

Garen, A. (1968). Science 160, 149.

Gillespie, D. u. Spiegelman, S. (1965). J. Mol. Biol. 12, 829.

Granboulan, N. u. Scherrer, K. (1969). Europ. J. Biochem. 9, 1.

Gschwender, H.H., Haller, W. u. Hofschneider, P.H. (1969). Biochim. Biophys. Acta, 190, 460.

Hall, B.D. u. Spiegelman, S. (1961). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 47, 137.

Hayashi, M. (1965). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 54, 1736.

Hayashi, M., Hayashi, M.N. u. Spiegelman, S. (1963 a). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 50, 664.

Hayashi, M., Hayashi, M.N. u. Spiegelman, S. (1963 b). Science 140, 1313.

Hayashi, M., Hayashi, M.N. u. Spiegelman, S. (1964). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 51, 351.

Hayashi, M.N. u. Hayashi, M. (1966). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 55, 635.

Hayes, P.H., Hayes, F. u. Guérin, M.F. (1966). J. Mol. Biol. 18, 499.

Hayes, W. (1964). In: The Genetics of Bacteria and Their Viruses. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Henry, T.J. u. Pratt, D. (1969). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 62, 800.

Herrlich, P. u. Schweiger, M. (1971). Molec. Gen. Genetics 110, 31.

Hoffmann-Berling, H. u. Mazé, R. (1964). Virology 22, 305.

Hofschneider, P.H. u. Preuss, A. (1963). J. Mol. Biol. 7, 450.

Hsu, Y.-C. (1968). Bacteriol. Rev. 32, 387.

Hudson, J.B. (1969). Europ. J. Biochem. 9, 112.

Ihler, G. u. Nakada, D. (1970). Nature (London) 228, 239.

Imamoto, F. u. Yanofsky, C. (1967 a). J. Mol. Biol. 28, 1.

Imamoto, F. u. Yanofsky, C. (1967 b). J. Mol. Biol. 28, 25.

Iwaya, M. u. Denhardt, D.T. (1971). J. Mol. Biol. 57, 159.

Jaenisch, R., Hofschneider, P.H. u. Preuss, A. (1966). J. Mol. Biol. 21, 501.

Jaenisch, R., Hofschneider, P.H. u. Preuss, A. (1969). Biochim. Biophys. Acta, 190, 88.

Jansz, H. u. Pouwels, P.H. (1965). Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 589.

Jorgensen, S.E., Buch, L.B. u. Nierlich, D.P. (1969). Science 164, 1067.

Kaerner, H.C. (1969). J. Mol. Biol. 42, 259.

Katz, L. u. Penman, S. (1966). Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 557.

Kepes, A. (1963). Biochim. Biophys. Acta, 76, 293.

Kepes, A. (1967). Biochim. Biophys. Acta, 138, 107.

Konings, R.N.H., Ward, R., Francke, B. u. Hofschneider, P.H. (1970). Nature (London) 226, 604.

Kourilsky, P., Marcaud, L., Sheldrick, P., Luzzati, D. u. Gros, F. (1968). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 61, 1013.

Kozloff, L.M. (1968). In: Molecular Basis of Virology. Ed. by Fraenkel-Conrat, H., New York: Reinhold Book Corp.

Krug, U. (1968). Doktorarbeit Universität München.

Kuwano, M., Schlessinger, D. u. Apirion, D. (1970). J. Mol. Biol. 51, 75.

Lindahl, L. u. Forchhammer, J. (1969). J. Mol. Biol. 43, 593.

Lindqvist, B.H. u. Sinsheimer, R.L. (1967). J. Mol. Biol. 28, 87.

Loening, U.E. (1967). Biochem. J. 102, 251.

Loening, U.E. (1969). Biochem. J. 113, 131.

Maaløe, O. u. Hanawalt, P.C. (1961). J. Mol. Biol. 3, 144.

Markert, A. u. Zillig, W. (1965). Virology 25, 88.

Marmur, J. u. Greenspan, C.M. (1963). Science 142, 387.

Marvin, D.A. (1968). Nature (London) 219, 485.

Marvin, D.A. u. Hohn, B. (1969). Bacteriol. Rev. 33, 172.

di Mauro, E., Snyder, L., Marino, P., Lamberti, A., Coppo, A. u. Tocchini-Valentini, G.P. (1969). Nature (London) 222, 533.

McCarthy, B.J. u. Holland, J.J. (1965). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 54, 880.

Meynell, E., Meynell, G.G. u. Datta, N. (1968). Bacteriol. Rev. 32, 55.

Michaelis, G. u. Starlinger, P. (1967). Molec. Gen. Genetics 100, 210.

Morikawa, N. u. Imamoto, F. (1969). Nature (London) 223, 37.

Morse, D.E., Baker, R.F. u. Yanofsky, C. (1968). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 60, 1428.

Morse, D.E., Mosteller, R., Baker, R.F. u. Yanofsky, C. (1969). Nature (London) 223, 40.

Nomura, M., Hall, B.D. u. Spiegelman, S. (1960). J. Mol. Biol. 2, 306.

Oda, K.-I., Sakakibara, Y. u. Tomizawa, J.-I. (1969). Virology 39, 901.

Okamoto, T., Sugiura, M. u. Takanami, M. (1969). J. Mol. Biol. 45, 101.

Pouwels, P.H., Knijnenburg, C.M., van Rotterdam, J., Cohen, J.A. u. Jansz, H.S. (1968). J. Mol. Biol. 32, 169.

Pratt, D. u. Erdahl, W.S. (1968). J. Mol. Biol. 37, 181.

Pratt, D., Tzagoloff, H. u. Beaudoin, J. (1969). Virology 39, 42.

Pratt, D., Tzagoloff, H., Erdahl, W.S. u. Henry, T.J. (1967). In: The Molecular Biology of Viruses. Ed. by Colter, J.S. and Paranchych, W. New York: Academic Press Inc.

Ray, D.S., Bscheider, H.P. u. Hofschneider, P.H. (1966). J. Mol. Biol. 21, 473.

Ray, D.S. Preuss, A. u. Hofschneider, P.H. (1966). J. Mol. Biol. 21, 485.

Rich, A., Penman, S., Becker, Y., Darnell, J. u. Hall, C. (1963). Science 142, 1658.

Roberts, J.W. (1969). Nature (London) 224, 1168.

Rudin, L. u. Albertson, P.Å. (1967). Biochim. Biophys. Acta, 134, 37.

Rueckert, R.R. u. Zillig, W. (1962). J. Mol. Biol. 5, 1.

Salivar, W.O., Tzagoloff, H. u. Pratt, D. (1964). Virology 24, 359.

Salser, W., Gesteland, R.F. u. Ricard, B. (1969). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 771.

Schwartz, T., Craig, E. u. Kennell, D. (1970). J. Mol. Biol. 54, 299.

Sedat, J.W., Kelly, R.B. u. Sinsheimer, R.L. (1967). J. Mol. Biol. 26, 537.

Sedat, J., Lyon, A. u. Sinsheimer, R.L. (1969). J. Mol. Biol. 44, 415.

Sedat, J.W. u. Sinsheimer, R.L. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 163.

Siegel, J.E.D. u. Hayashi, M. (1967). J. Mol. Biol. 27, 443.

Sinsheimer, R.L. (1959 a). J. Mol. Biol. 1, 37.

Sinsheimer, R.L. (1959 b). J. Mol. Biol. 1, 43.

Sinsheimer, R.L. (1966). In: Procedures in Nucleic Acid Research. Ed. by Cantoni, G.L. and Davies, D.R. New York: Harper and Row.

Sinsheimer, R.L. (1968). In: Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 8. New York: Academic Press Inc.

Sinsheimer, R.L., Starman, B., Nagler, C. u. Guthrie, S. (1962). J. Mol. Biol. 4, 142.

Spiegelman, S. (1963 a). In: Informational Macromolecules. Ed. by Vogel, H.J. New York: Academic Press Inc.

Spiegelman, S. (1963 b). Science 142, 493.

Stone, A.B. (1967). Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 247.

Strauss jr., J.H., Kelly, R.B. u. Sinsheimer, R.L. (1968). Biopolymers 6, 793.

Sugiura, M., Okamoto, T. u. Takanami, M. (1969). J. Mol. Biol. 43, 299.

Summers, W.C. (1970). J. Mol. Biol. 51, 671.

Summers, W.C. u. Siegel, R.B. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 253.

Takanami, M. (1966). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 611.

Takanami, M., Okamoto, T. u. Sugiura, M. (1970). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 179.

Tessman, E.S. (1966). J. Mol. Biol. 17, 218.

Tessman, I. (1968). Virology 35, 330.

Tessman, I., Kumar, S. u. Tessman, E.S. (1967). Science 158, 267.

Tessman, I., Poddar, R.K. u. Kumar, S. (1964). J. Mol. Biol. 9, 352.

Tocchini-Valentini, G.P., Stodolsky, M., Aurisicchio, A., Sarnat, M., Graziosi, F., Weiss, S.B. u. Geiduschek, E.P. (1963). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 50, 935.

Tonegawa, S. u. Hayashi, M. (1966). Biochim. Biophys. Acta, 123, 634.

Tzagoloff, H. u. Pratt, D. (1964). Virology 24, 372.

Vanderbilt, A.S. u. Tessman, I. (1970). Nature (London) 228, 54.

Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R. u. Laipis, P. (1965). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 53, 1104.

Vinograd, J., Lebowitz, J. u. Watson, R. (1968). J. Mol. Biol. 33, 173.

Volkin, E. u. Astrachan, L. (1956). Virology 2, 149.

Wallach, D.F.H. (1968). Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 61, 868.

Warnaar, S.O., de Mol, A., Mulder, G., Abrahams, P.J. u. Cohen, J.A. (1970). Biochim. Biophys. Acta 199, 340.

Warnaar, S.O., Mulder, G., van den Sigtenhorst-van der Sluis, I., van Kesteren, L.W. u. Cohen, J.A. (1969). Biochim. Biophys. Acta, 174, 239.

Weiss, B. u. Richardson, C.C. (1966). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 471.

Whitefield jr., H.J., Gutnick, D.L., Margolies, M.N., Martin, R.G., Rechler, M.M. u. Voll, M.J. (1970). J. Mol. Biol. 49, 245.

Wilson, D.B. u. Hogness, D.S. (1969). J. Biol. Chem. 244, 2143.

Lebenslauf

Am 26. Februar 1943 wurde ich in Breslau als Sohn des Regierungsrats Fritz Jacob und seiner Ehefrau Eva-Lotte Jacob, geb. Kittner, geboren. Vom Herbst 1949 bis Frühjahr 1962 besuchte ich die Schule, zuletzt das Helmholtz-Gymnasium in Bielefeld, an dem ich im Frühjahr 1962 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1962 begann ich das Chemiestudium an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz, an der ich am 18. Mai 1965 das Vordiplom ablegte. Vom Sommersemester 1966 an setzte ich mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort. Im Juli 1967 legte ich dort die mündliche Prüfung des Hauptdiploms ab. Im September 1967 begann ich meine Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Hofschneider, die ich ab September 1968 in meiner Doktorarbeit fortführte. Während meiner Promotionszeit war ich Stipendiat der Stiftung Volkswagenwerk.